



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΗ VP1
ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΣΗΠΤΗ
ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ**

**LABORATORY INVESTIGATION OF THE ENTEROVIRAL
VP1 GENOMIC REGION AND ASSOCIATION WITH
ASEPTIC MENINGITIS**



ΚΟΣΜΑ ΕΛΕΝΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας
με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τ.ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ:

Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Εδιμβούργου
(Τομέας Κλινικής Μικροβιολογίας)
Επιστημονική υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της
Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:

Ειδικό Ερευνητικό και Διδακτικό Προσωπικό (ΕΕΔΙΠ)
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας και στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από τον Ιούνιο του 2011 έως τον Ιούνιο του 2012.

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όσο και για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ Τζωρτζίνα Τζανακάκη και την Δρ Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για την καθοδήγηση τους και την βοήθειά τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων, την συμπαράσταση τους σε όποιες δυσκολίες παρουσιάστηκαν κατά την τέλεση τους καθώς και για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας: Κεσανόπουλο Κωνσταντίνο, Αθανασία Ξηρογιάννη, Βασιλική Βλάχου και Γιούλη Καζάνη, όπως και τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τόσο για την βοήθεια και συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί είναι ένα γένος θετικών μονόκλωνων RNA ιών (Picornaviridae) που σχετίζονται με πολλές ασθένειες τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλα θηλαστικά. Αυτοί οι ιοί έχουν διάμετρο περίπου 30nm και δε διαθέτουν έλυτρο αλλά ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Σε ορολογικές μελέτες έχουν διακριθεί περισσότεροι από 66 ορότυποι βασιζόμενοι σε δοκιμές εξουδετέρωσης αντισωμάτων. Με βάση την παθογένεια τους στον άνθρωπο και τα ζώα, οι εντεροϊοί κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες: τους πολιοϊούς, τους Coxsackie A ιούς, τους Coxsackie B και τους Echo ιούς, με σημαντικές επικαλύψεις στις βιολογικές ιδιότητες των ιών των διάφορων ομάδων. Οι πιο πρόσφατα απομονωμένοι εντεροϊοί ονομάζονται με ένα σύστημα συνεχόμενων αριθμών : EV68, EV69, EV70 και EV71 κλπ.

Οι εντεροϊοί πλήττουν εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο κάθε χρόνο, και ανιχνεύονται συχνά σε αναπνευστικές εκκρίσεις (πχ σάλιο, πτύελα, ρινική βλέννα) και κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου. Ιστορικά, η πολιομυελίτιδα ήταν η πιο σημαντική ασθένεια που προκαλείται από εντεροϊό, τους ιούς της Πολιομυελίτιδας. Όσον αφορά την μηνιγγίτιδα, οι περισσότερες περιπτώσεις της οξείας μορφής της ασθένειας αυτής, οφείλονται σε ιογενή λοίμωξη, με τα βακτήρια, τους μύκητες και τα παράσιτα να αποτελούν τα επόμενα σε συχνότητα αίτια. Οι εντεροϊοί αποτελούν τη πιο κοινή αναγνωρίσιμη αιτία πρόκλησης άσηπτης μηνιγγίτιδας καθώς ευθύνονται για το 75-90% των περιπτώσεων, με τους echo ιούς να αποτελούν τη συνηθέστερη αιτία και τους coxsackie ιούς να ακολουθούν. Στους ιούς που μπορούν να προκαλέσουν άσηπτη μηνιγγίτιδα περιλαμβάνονται εκτός από τους εντεροϊούς και οι ιοί του απλού έρπητα τύπου 2 (και λιγότερο συχνά τύπου 1), ο ιός της ανεμοβλογιάς – έρπητα ζωστήρα, ο ιός της παρωτίτιδας, ο HIV και ο ιός της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας κ.α.

Οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση των παθογόνων έχουν βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια, επιτρέποντας πιο ακριβείς διαγνώσεις και γρηγορότερα αποτελέσματα. Στον τομέα της θεραπείας της ιογενούς μηνιγγίτιδας, όμως, έχουν πραγματοποιηθεί λιγότερες εξελίξεις, και οι θεραπείες παραμένουν μη αποτελεσματικές για τα περισσότερα παθογόνα.

Στη συνέχεια θα αναλύσουμε περισσότερο την ασθένεια της μηνιγγίτιδας δίνοντας έμφαση στην ιογενή μορφή της καθώς και την ομάδα των ιών που αποτελούν την πιο κοινή αναγνωρίσιμη αιτία της.

Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν 158 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ασθενών με πιθανή άσηπτη μηνιγγίτιδα

προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία κάποιου εντεροϊού. Με την τεχνική της RT-PCR διαπιστώθηκε η παρουσία εντεροϊών σε 22 από τα 158 δείγματα ενισχύοντας μία περιοχή της 5'UTR η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών. Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό του ορότυπου του εντεροϊού στα 22 ανωτέρω θετικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε RT-PCR στην VP1 γενωμική περιοχή, όπου μόνο 7 δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχηση των 7 αυτών δειγμάτων και μετά από ανάλυση βρέθηκε ότι η αλληλουχία τους παρουσιάζει ομολογία με τους ορότυπους Echo 6, Echo 9, Echo 13 και Echo 30. Τέλος, έγινε κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για κάθε ορότυπο, όπου παρουσιάζονται οι σχέσεις ανάμεσα στους Echo ιούς που χαρακτηρίστηκαν στην εργασία αυτή με στελέχη του ίδιου οροτύπου που κυκλοφόρησαν παγκοσμίως.

Abstract

Enteroviruses are positive single strand RNA viruses (Picornaviridae) associated with diseases in human and other mammalian species. Picornaviridae are not enveloped with an icosahedral capsid with a diameter of 30nm. More than 66 serotypes are identified in serological studies with neutralizing antibodies. Enteroviruses are classified into 4 groups based on the pathogenesis on humans; polioviruses, Coxsackie A viruses, Coxsackie B viruses and Echo viruses, presenting significant overlaps in biological features between these groups. Recently isolated enteroviruses are classified into a new system of consecutive numbers; EV68, EV69, EV70, EV71 etc.

Enteroviruses affect millions of people every year worldwide and usually are detected in respiratory secretions (e.g. saliva, sputum, and nasal mucus) and stools. Historically, poliomyelitis was the most important disease caused by polioviruses. As regards to meningitis, the most cases of acute phase of this disease are caused by viral infection, followed by bacterial, fungal and parasitical infections. Enteroviruses are the most common identifiable cause of aseptic meningitis and account for 75–90% of cases, of which cases Echo viruses are the most common cause of aseptic meningitis, followed by coxsackie virus. Other viruses that caused aseptic meningitis are, simplex herpes virus type 2 and type 1, herpes zoster, mumps, HIV and lymphocytic choriomeningitis virus.

Diagnostic methods for the rapid identification of pathogens have been improved last years.

In this study, we investigated 158 samples of cerebrospinal fluids from patients with clinical signs of aseptic meningitis, in order to detect enteroviruses. Using RT-PCR in a conserved region in 5' UTR of enteroviruses the presence of enteroviruses was detected in 22 out of 158 samples. Furthermore, we performed also RT-PCR in VP1 genomic region to identify the serotype of enterovirus. Seven samples out of the 22 were successfully amplified, cloned and sequenced. Sequencing results showed homology between these samples with Echoviruses serotypes, Echo 6, Echo 9, Echo 13 and Echo 30 viruses. Phylogenetic trees for each serotype were constructed and repressed the association among the isolated enteroviruses and related serotypes worldwide.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΓΑΓΩΓΗ

- 1.1. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ
- 1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.4.1. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ
 - 1.4.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
 - 1.4.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.4.3.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
 - 1.4.3.2. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RNA ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.4.3.3. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.4.3.4. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ RNA ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.4.3.5. ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΞΟΔΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ
- 1.5. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.5.1. ΜΕΤΑΜΛΑΞΕΙΣ
 - 1.5.2. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ
 - 1.5.3. QUASISPECIES ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.6.1. ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.6.2. ΠΟΡΕΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
 - 1.6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ
 - 1.6.4. ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.7. ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.8. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.9. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΕΤΑΙ ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ
 - 1.9.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
 - 1.9.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΗΠΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ
 - 1.9.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
- 1.10. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

2. ΣΚΟΠΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 3.1. ΥΛΙΚΑ
 - 3.1.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ
 - 3.1.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ
 - 3.1.3. ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ
 - 3.1.4. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
 - 3.1.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

3.1.6. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

3.1.7. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

3.1.8. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

3.1.9. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΪΚΟΥ RNA

3.2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ – ONE-STEP RT-PCR

3.2.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

3.2.4. AUTONESTED PCR

3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

3.2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

3.2.7. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ (LIGATION)

3.2.8. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

3.2.9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.2.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ DNA (NYCLEOSPIN PLASMID DNA PURIFICATION, MACHEREY-NAGEL)

3.2.11. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

3.2.12. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

3.2.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

4.2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ VP1 ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ

4.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ

4.5. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2005-2011

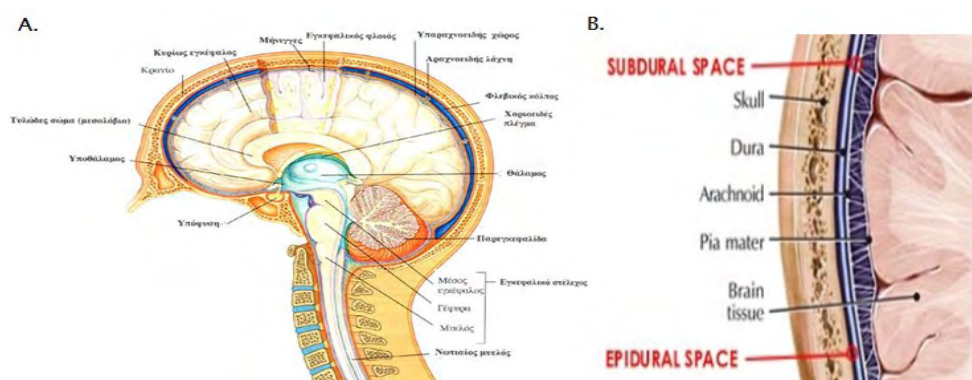
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΙΓΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Ως μηνιγγίτιδα περιγράφεται η φλεγμονή των προστατευτικών μεμβρανών που περιβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και είναι γνωστές ως μήνιγγες. Οι μήνιγγες αποτελούνται από τρεις μεμβράνες που, μαζί με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περικλείουν και προστατεύουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό (το κεντρικό νευρικό σύστημα). Η χοριοειδής μήνιγγα (pia mater) είναι μία λεπτή, αδιαπέραστη μεμβράνη, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του εγκεφάλου, ακολουθώντας το ακριβές περίγραμμα των ελίκων του. Η αραχνοειδής μήνιγγα (arachnoid) είναι ένας χαλαρός θύλακας πάνω από τη χοριοειδή μήνιγγα. Ο υπααραχνοειδής χώρος (epidural space) διαχωρίζει την αραχνοειδή και τη χοριοειδή μήνιγγα και περιέχει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η εξωτερική μεμβράνη, η σκληρά μήνιγγα (dural mater), είναι μία παχιά, ανθεκτική μεμβράνη, που προσφύεται τόσο στην αραχνοειδή μήνιγγα όσο και στο κρανίο. Η μηνιγγίτιδα συνήθως προκαλείται από λοίμωξη από ιούς ή άλλους μικροοργανισμούς. Οι περισσότερες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας οφείλονται σε ιογενή λοίμωξη, με τα βακτήρια, τους μύκητες και τα παράσιτα να αποτελούν τα επόμενα πιο συχνά αίτια. Τέλος, η μηνιγγίτιδα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μη λοιμωδών αιτιών (Sáez-Llorens και McCracken, 2003, van de Beek et al., 2006, Panackel C et al., 2006).



Εικόνα 1: Α) Δομή εγκεφάλου, οβελιαία τομή, Β) Διάταξη των μεμβρανών των μηνίγγων.

Τα είδη των βακτηρίων που προκαλούν μικροβιακή μηνιγγίτιδα ποικίλουν ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα των ασθενών. Στα πρόωρα νεογνά και τα βρέφη μέχρι 3 μηνών τα πιο κοινά αίτια είναι ο στρεπτόκοκκος της ομάδας Β (*Streptococcus group B* ή *Streptococcus agalactiae*), που αποικίζει φυσιολογικά στον κόλπο και είναι αίτιο μηνιγγίτιδας κυρίως την πρώτη εβδομάδα της ζωής, και το

κολοβακτηρίδιο (*Escherichia coli*) που αποικίζει φυσιολογικά το γαστρεντερικό σωλήνα. Η λιστέρια (*Listeria monocytogenes*), ορότυπος IVb, μπορεί επίσης να προσβάλλει τα νεογέννητα και εμφανίζεται σε επιδημίες.

Τα μεγαλύτερα παιδιά προσβάλλονται συχνότερα από τη ναισσέρια της μηνιγγίτιδας ή μηνιγγιτιδόκοκκο (*Nisseria meningitidis*), από τον στρεπτόκοκκο της πνευμονίας ή πνευμονιόκοκκο (*Streptococcus pneumoniae*), ορότυπους 6, 9, 14, 18 και 23, και εκείνα κάτω των 5 ετών από *Haemophilus influenzae*, τύπου B (σε χώρες που δεν έχει καθιερωθεί εμβολιασμός). Στους ενήλικες, ο μηνιγγιτιδόκοκκος και ο πνευμονιόκοκκος μαζί προκαλούν το 80% όλων των περιπτώσεων μικροβιακής μηνιγγίτιδας, με αυξημένη εμφάνιση της λιστέριας στους ενήλικες άνω των 50 ετών. Μετά την καθιέρωση του αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολιασμού η επίπτωση της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας ελαττώθηκε. Η φυματιώδης μηνιγγίτιδα, που οφείλεται σε λοίμωξη από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*) είναι πιο συχνή σε περιοχές που ενδημεί η φυματίωση, αλλά επίσης εμφανίζεται σε ασθενείς με νόσο του ανοσοποιητικού, όπως το AIDS. Υποτροπιάζουσες μικροβιακή μηνιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί από υφιστάμενες ανατομικές ανωμαλίες, συγγενείς ή επίκτητες, ή από διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ανατομικές ανωμαλίες επιτρέπουν την επικοινωνία ανάμεσα στο εξωτερικό περιβάλλον και το νευρικό σύστημα. Το πιο συχνό αίτιο υποτροπιάζουσας μηνιγγίτιδας είναι τα κατάγματα του κρανίου, και ειδικά εκείνα που αφορούν τη βάση του κρανίου ή επεκτείνονται διαμέσου των παραρρίνιων κόλπων και του οστέινου λαβύρινθου (λιθοειδές) (Tunkel AR et al., 2004, Tebruegge M και Curtis N, 2008).

Παρασιτικό αίτιο πιθανολογείται όταν υπάρχει επικράτηση των εωσινόφιλων στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ). Τα πιο κοινά παράσιτα που εμπλέκονται είναι ο *Angiostrongylus cantonensis* και το *Gnathostoma spinigerum*. Η φυματίωση, η σύφιλη, η κρυπτοκοκκίαση και κοκκιδιοδομύκωση είναι σπάνια αίτια ηωσινοφιλικής μηνιγγίτιδας και πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν (Panackel C et al., 2006, Weller PF et al., 1993, Schermoly MJ et al., 1988).

Η ιογενή μηνιγγίτιδα είναι πιο συχνή το καλοκαίρι και στις περισσότερες περιπτώσεις ιογενούς μηνιγγίτιδας η ασθένεια είναι σχετικά ήπια, με συμπτώματα όπως πονοκέφαλο, πυρετό και γενικά αίσθημα αδιαθεσίας. Η κλινική πορεία της νόσου είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη, με πλήρη ανάρρωση σε 7-10 ημέρες, χωρίς ιατρική περίθαλψη. Αυτός είναι ένας λόγος για τον οποίο είναι δύσκολο να καταγραφούν οι περιπτώσεις ιογενούς μηνιγγίτιδας που συμβαίνουν

στην πραγματικότητα, αλλά είναι αρκετά κοινή ασθένεια και κατά πάσα πιθανότητα πιο κοινή από βακτηριακή μηνιγγίτιδα. Μερικές φορές η νόσος εξελίσσεται με περαιτέρω συμπτώματα όπως ναυτία και εμετό, αυχενική δυσκαμψία, πόνος στο λαιμό, πόνος στην κοιλιά, πόνος στους μυς, φωτοφοβία, διαταραχές συνείδησης. Πολύ ασυνήθιστα, μπορεί να γίνει απειλητική για τη ζωή ή να προκαλέσει μακροχρόνιες επιπτώσεις, όταν το παθογόνο προκαλεί μια πιο περίπλοκη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα ή μηνιγγομυελίτιδα. Επιπρόσθετα, η ιογενής μηνιγγίτιδα δεν συνδέεται συνήθως με σηψαιμία. Αν και οι περισσότεροι άνθρωποι αναρρώνουν μέσα σε 5-15 ημέρες, μπορεί να χρειαστούν περισσότερο χρόνο, και για μερικούς ασθενείς η περίοδος αποκατάστασης είναι παρατεταμένη. Τα αντιβιοτικά δεν είναι αποτελεσματικά εναντίον των ιών, έτσι η θεραπεία συνήθως περιορίζεται στην άμβλυνση των συμπτωμάτων της νόσου (για παράδειγμα, παυσίπονα και αντιεμετικά). Πολλοί διαφορετικοί ιοί μπορούν να προκαλέσουν ιογενή μηνιγγίτιδα, και οι περισσότεροι άνθρωποι εκτίθενται σε ορισμένους από αυτούς κατά τη διάρκεια της ζωής τους χωρίς την ανάπτυξη της μηνιγγίτιδας. Οι ιοί που προκαλούν ιογενή μηνιγγίτιδα είναι: Ιός του έρπη (HSV-1 και HSV-2), Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), Tick-borne encephalitis, Japanese B encephalitis, ο ιός του δυτικού Νείλου, ο ιός της παρωτίτιδας, ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), Varicella-zoster virus (VZV) (S. A E Logan and E. MacMahon, 2008). Από τους εντεροϊούς μηνιγγίτιδα προκαλούν οι polio ιοί, echoviruses και coxsackie viruses. Οι ιοί αυτοί είναι πιο κοινοί στα παιδιά. Συνήθως παρουσιάζεται καλοήγης μηνιγγίτιδα. Ωστόσο, σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα προκαλείται σε νεογνά, ανοσοκατεσταλμένα άτομα και σε συνδυασμό με επιδημική λοίμωξη από εντεροϊό 71. Οι συχνότερες σοβαρές επιπλοκές είναι η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και μυο/περικαρδίτιδα.

Ο όρος άσηπτη μηνιγγίτιδα αναφέρεται αόριστα σε όλες τις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας που δεν μπορεί να αποδειχθεί η μικροβιακή λοίμωξη. Αυτή συνήθως οφείλεται σε ιούς, αλλά μπορεί και να οφείλεται σε άλλη μικροβιακή λοίμωξη που έχει ήδη μερικώς αντιμετωπιστεί, με εξάλειψη των μικροβίων από τις μήνιγγες, ή με λοίμωξη σε παρακείμενη στις μήνιγγες περιοχή. Σε ποσοστό >80%, η ιογενής μηνιγγίτιδα οφείλεται σε εντεροϊούς και συνεπώς ο όρος άσηπτη μηνιγγίτιδα αφορά κυρίως σε λοίμωξη από εντεροϊούς (S. A. E. Logan and E. MacMahon, 2008). Άσηπτη μηνιγγίτιδα μπορεί να προκαλέσει και η ενδοκαρδίτιδα (λοίμωξη των καρδιακών βαλβίδων) με τη διασπορά μικροβιακού υλικού μέσα στην κυκλοφορία. Επίσης, η σπειροχαίτη, ένα γένος βακτηρίων που περιλαμβάνει την ωχρά σπειροχαίτη (*Treponema pallidum*) (αίτιο της σύφιλης) και η μπορέλλια (*Borrelia burgdorferi*) (αίτιο

της νόσου του Lime) μπορούν να προκαλέσουν άσηπτη μηνιγγίτιδα. Με μηνιγγίτιδα μπορεί ακόμη να εμπλέκεται και η εγκεφαλική ελονοσία. Μυκητιασική μηνιγγίτιδα π.χ. οφειλόμενη σε κρυπτόκοκκο (*Cryptococcus neoformans*) είναι τυπική σε ασθενείς με ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού. Η αμοιβαδική μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε λοίμωξη από αμοιβάδα, όπως η *Naegleria fowleri*, μεταδίδεται από πηγές γλυκού νερού.

Μηνιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί και από ποικιλία μη λοιμωδών παραγόντων, όπως ύπαρξη καρκίνου στις μήνιγγες (καρκινωματώδης ή νεοπλασματική μηνιγγίτιδα) και από συγκεκριμένα φάρμακα (κυρίως μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά, και ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες). Είναι δυνατόν επίσης να προκληθεί από διάφορες φλεγμονώδης καταστάσεις, όπως η σαρκοείδωση (η οποία τότε αποκαλείται νευροσαρκοείδωση), νοσήματα του συνδετικού ιστού, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, και κάποιες αγγειίτιδες (φλεγμονώδης κατάσταση του τοιχώματος των αγγείων), όπως η νόσος του Behçet. Οι επιδερμοειδείς και οι δερματοειδείς κύστες μπορεί να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα με αποβολή ερεθιστικού υγρού στον υπαρχνοειδή χώρο. Η μηνιγγίτιδα Mollaret είναι ένα σύνδρομο επαναλαμβανομένων επεισοδίων άσηπτης μηνιγγίτιδας, που πιστεύεται ότι προκαλείται από τον ιό του απλού έρπητα τύπου 2. Σπάνια, μηνιγγίτιδα μπορεί να προκαλέσει η ημικρανία, όμως αυτή η διάγνωση τίθεται μόνο εφόσον έχουν αποκλεισθεί άλλα πιθανά αίτια (Chamberlain MC et al., 2005, Moris G et al., 1999).

ΙΟΣ	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ	ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ
Enteroviruses :polio, echoviruses και coxsackie	Πιο κοινοί στα παιδιά. Υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης την περίοδο καλοκαίρι/φθινόπωρο σε εύκρατο κλίμα	Συνήθως καλοήθης μηνιγγίτιδα. Νοσηρότητα και θνησιμότητα σε : νεογνά, ανοσοκατεσταλμένα άτομα και σε συνδυασμό με επιδημική λοίμωξη από EV 71. Συχνότερες σοβαρές επιπλοκές: μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και μυο/περικαρδίτιδα .
ιός της παρωτίτιδας	Συχνή εμφάνιση σε μη εμβολιασμένους πληθυσμούς. Μεγαλύτερο ποσοστό προσβεβλημένων αρρένων από θηλέων	Συνήθως αυτοπεριοριζόμενη μηνιγγίτιδα. Πρήξιμο στους σιελογόνους αδένες στο 50%
West Nile virus	Μόλυνση από κουνούπια που κορυφώνεται στα τέλη του καλοκαιριού. Εμφανίζει ενδημικότητα στην Ασία, Ευρώπη, Αφρική και Βόρεια Αμερική. Μέχρι πρόσφατα δεν έχει παρατηρηθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο. Μεγαλύτερο ποσοστό μηνιγγοεγκεφαλίτιδας.	Θνησιμότητα σε 4–13% και υψηλότερο ποσοστό σε περιπτώσεις ηλικιωμένων, ανοσοκατεσταλμένων και διαβητικών ατόμων. Στο 50% των περιστατικών με εγκεφαλίτιδα παραμένουν μόνιμες νευρολογικές ή ψυχιατρικές διαταραχές.
Japanese B encephalitis	Μόλυνση από κουνούπια, κυρίως στην νοτιοανατολική Ασία. Μεγάλος φυσικός ξενιστής ο χοίρος. Πιο συχνή σε παιδιά και σε ενήλικες χωρίς ανοσολογικό σύστημα.	Θνησιμότητα σε ποσοστό 20–30% και τα περιστατικά μακροπρόθεσμων νευρολογικών αναπηριών σε ποσοστό 30%
Tick-borne encephalitis	Μόλυνση από κουνούπια, κυρίως σε Ευρώπη και Ασία, συχνές την άνοιξη και στις αρχές του καλοκαιριού	Ποσοστό θνησιμότητας 1–20% και υψηλότερο στα στελέχη της Άπω Ανατολής. Συνήθως μεγαλύτερη σε διάρκεια ασθένεια από άλλες ιογενείς εγκεφαλίτιδες

Human immunodeficiency virus (HIV)	Αναπτύσσεται μηνιγγίτιδα σε ποσοστό 5-10% ασθενών γύρω ή λίγο μετά την εμφάνιση των αντισωμάτων κατά του HIV (ασθένεια ορομετατροπής) και περιστασιακά κατά την διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης	Οι επιπλοκές είναι σπάνιες στη αρχή της λοίμωξης από HIV. Η χρόνια λοίμωξη προκαλεί άνοια, ενώ η ασθένεια ορομετατροπής μπορεί επίσης να περιλαμβάνει και maculorapular εξάνθημα, πυρετό, μυαλγία και λεμφαδενοπάθεια.
Herpes simplex virus (HSV-1 και HSV-2)	Και οι δύο ιοί προκαλούν σποραδικές λοιμώξεις. HSV-1 σχετίζεται περισσότερο με εγκεφαλίτιδες ενώ ο HSV-2 με μηνιγγίτιδες. Άλλοι ερπητοϊοί που προκαλούν μηνιγγίτιδες είναι οι : Epstein-barr virus και human herpesvirus 6 (HHV-6).	Η θνησιμότητα αγγίζει το 70% των περιστατικών εγκεφαλίτιδας αν δεν αντιμετωπιστεί η ασθένεια. Προκαλείται συνήθως μια κεντρική εγκεφαλίτιδα που επηρεάζει τους κροταφικούς λοβούς. Μπορεί να προκληθεί επαναλαμβανόμενη μηνιγγίτιδα.
Cytomegalovirus (CMV)	Συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς	Συνήθως προκαλείται κεντρική εγκεφαλίτιδα και στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται μαζί με μια ασθένεια που μοιάζει με μονοπυρρύνωση. Ακόμα η λοίμωξη μπορεί να συνοδεύεται από αμφιβληστροειδίτιδα που προκαλείται από τον CMV.
Varicella-zoster virus (VZV)	Μηνιγγίτιδα ως σπάνια επιπλοκή της ανεμοβλογιάς ή του VZV, συχνότερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.	Περιστασιακά η μηνιγγίτιδα μπορεί να εμφανιστεί και χωρίς τα κυστίδια του VZV. Μπορεί να εμφανιστεί με εγκεφαλικό επεισόδιο που ακολουθεί την εμφάνιση της χαρακτηριστικής ζωστήρας σε ηλικιωμένους ή με πιο διάχυτη χρόνια εγκεφαλίτιδα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Πίνακας 1: Ιοί που αποτελούν τις πιο συνηθισμένες αιτίες ιογενούς μηνιγγίτιδας καθώς και κάποια επιδημιολογικά χαρακτηριστικά τους.

1.2. Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

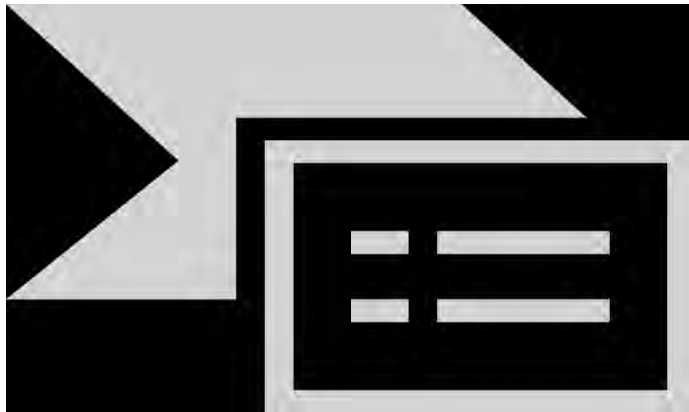
Οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι μια σημαντική αιτία παθογένειας και θνησιμότητας σε όλο τον κόσμο. Το γένος των εντεροϊών είναι μέλος της οικογένειας των picornavirus και περιλαμβάνει τους πολιοϊούς (PV), τους Coxsackie A ιούς (CAV), τους Coxsackie B ιούς (CBV) και τους Echo ιούς (E) (Knipe and Howley, 2007). Οι νέοι εντεροϊοί που απομονώνονται αριθμούνται, ξεκινώντας από τον Εντεροϊό 68 (EV68). Οι εντεροϊοί σχετίζονται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως η μυοκαρδίτιδα (Klingel et al., 1992), παγκρεατίτιδα (Ramsingh et al., 2008) και χρόνια φλεγμονώδη μυοπάθεια (Tam PE and Messner RP, 1999). Οι ασθένειες που προκαλούνται από εντεροϊούς δεν είναι περιορισμένες μόνο στη γνωστή μάστιγα της ανθρωπότητας καθ' όλη την διάρκεια της ιστορίας, την πολιομυελίτιδα. Οι μη-πόλιο εντεροϊοί στοχεύουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και είναι υπεύθυνοι για πολλές κλινικές εκδηλώσεις, όπως, εγκεφαλίτιδα και μηνιγγίτιδα (Michosh et al., 2007). Οι μακροχρόνιες συνέπειες την μόλυνσης από εντεροϊούς στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Επιπλέον, οι εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με αυτοάνοσες ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η χρόνια φλεγμονώδη μυοπάθεια, η χρόνια μυοκαρδίτιδα, πιθανά εν μέρη λόγω της μακροχρόνιας παρουσίας του ιού. Τέλος, οι εντεροϊοί, ίσως να είναι ικανοί να επιμένουν μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, πιθανά προκαλώντας μόνιμη νευροπάθεια (Rhoades et al., 2011).

Οι πρώτες αναφορές για τους εντεροϊούς έγιναν για τον ιό της πολιομυελίτιδας. Τον 19^ο αιώνα (1840) περιγράφηκε για πρώτη φορά η πολιομυελίτιδας, ως περιστατικά παραλυτικής και εμπύρετης ασθένειας (Pallansh et al., 2001). Αργότερα, το 1909, οι Landsteiner και Porrer μετέδωσαν την παραλυτική νόσο σε πιθήκους με ενοφθαλμισμό εκχυλίσματος κοπράνων από ασθενή με παραλυτική νόσο και η πολιομυελίτιδα θεωρήθηκε ιογενής νόσος. Στην συνέχεια, το 1948, απομονώθηκαν ιοί από νεογέννητα ποντίκια, στα οποία είχε ενοφθαλμιστεί εκχύλισμα κοπράνων, προερχόμενο από παιδιά με παράλυση στην πόλη Cocksackie, στην βόρεια Αμερική. Αυτοί οι ιοί ονομαστήκαν “Cocksackie” ιοί είναι οι πρώτοι που απομονώθηκαν από την κατηγορία των Cocksackie A ιών (Dalldorf et al., 1948). Το 1949 απομονώθηκε ο πρώτος ιός Cocksackie της ομάδας B από ασθενείς στους οποίους είχε διαγνωστεί μη παραλυτική πολιομυελίτιδα ή άσηπτη μηνιγγίτιδα (Melnick, et al. 1949). Το 1951 για πρώτη φορά, οι ιοί Cocksackie διαχωρίστηκαν σε δυο διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με την παθογένεια τους πάνω σε νεογέννητα ποντίκια και την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες (Robbins et al., 1951). Ακολούθησε η απομόνωση και άλλων ιών και η μελέτη τους σε κυτταρικές σειρές. Οι ιοί αυτοί, παρόλο που προκαλούσαν κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις στις καλλιέργειες κυττάρων, παρόμοιες με αυτές από τους ιούς πολιομυελίτιδας και Cocksackie, δεν ήταν γνωστό αν σχετιζόνταν με την νόσο. Οι ιοί αυτοί ονομάστηκαν «ορφανοί ιοί» και αργότερα έγιναν γνωστοί με το όνομα Echo (Enteric Cytopathogenic Human Orphan). Οι Echo ιοί απομονώθηκαν από υγιή παιδιά, καθώς και από ασθενείς που παρουσίαζαν άσηπτη μηνιγγίτιδα ή άλλα σύνδρομα. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη των Cocksackie ιών μπορούσαν να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες κυττάρων ενώ αντίθετα δεν προκαλούσαν παράλυση σε νεογέννητα ποντίκια. Επίσης, ορισμένα στελέχη Echo ιών προκαλούν παθογένεια στα νεογέννητα ποντίκια. Για τους λόγους αυτούς αναφέρθηκε ότι ο τρόπος ταξινόμησης των ανθρώπινων εντεροϊών ήταν ανεπαρκής. Πλέον, κάθε νέος εντεροϊός προσδιορίζεται με ένα διαδοχικό αραβικό αριθμό, αρχίζοντας με τον εντεροϊό 68 (EV68) (Melnick et al., 1974).

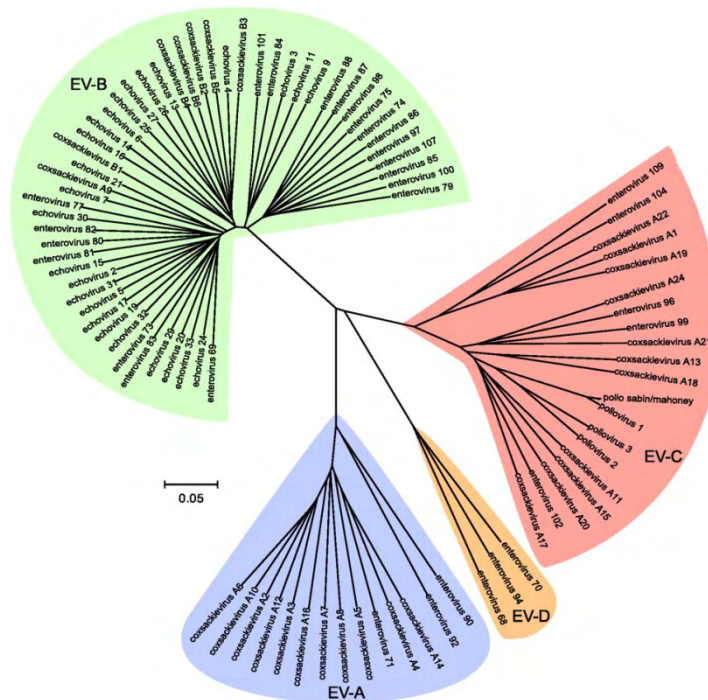
1.3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η κλασσική κατηγοριοποίηση των εντεροϊών περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες: Πολιοϊούς (Polioviruses, PVs), Cocksackie ιούς A (CAV), Cocksackie B (CBV) και ιούς ECHO (Enteric Cytopathic Human Orphan). Όμως, η μεγάλη φυλογενετική αλληλοεπικάλυψη ανάμεσα σε αυτές τις τέσσερις

ομάδες έχει οδηγήσει στην δημιουργία ενός νέου συστήματος κατηγοριοποίησης με διαδοχικούς αριθμούς των πιο πρόσφατα απομονωμένων εντεροϊών (όπως ο εντεριός-71, εντεροϊός -72 κτλ.) (Oberste et al., 2002, Rhoades et al., 2011). Έτσι το γένος των εντεροϊών αποτελείται από 10 είδη: Ανθρώπινοι εντεροϊοί A (Human enterovirus A), Ανθρώπινοι εντεροϊοί B (Human enterovirus B), Ανθρώπινοι εντεροϊοί C (Human enterovirus C), Ανθρώπινοι εντεροϊοί D (Human enterovirus D), Simian εντεροϊοί A, εντεροϊοί των βοοειδών (Bovine enterovirus), εντεροϊοί B των χοίρων (Porcine enterovirus B), ανθρώπινος ρινοϊός A (Human rhinovirus A), ανθρώπινος ρινοϊός B (Human rhinovirus B), και ανθρώπινος ρινοϊός C (Human rhinovirus C). Δυο επιπλέον είδη έχουν προταθεί, οι εντεροϊοί F και εντεροϊοί J ([http://www. picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm](http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm)) (Εικόνες 2 και 3).



Εικόνα 2: Κκατηγοριοποίηση των ανθρώπινων εντεροϊών (Sung Ho Cha, 2008).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο των εντεροϊών με την χρήση ολόκληρων των γονιδιωμάτων τους. Τα προγράμματα ClustalW και MEGA χρησιμοποιήθηκαν για τις ομοπαράθεσεις και την κατασκευή του δέντρου, αντίστοιχα, με την μέθοδο neighbor-joining (Yozwiak NL et al., 2010).

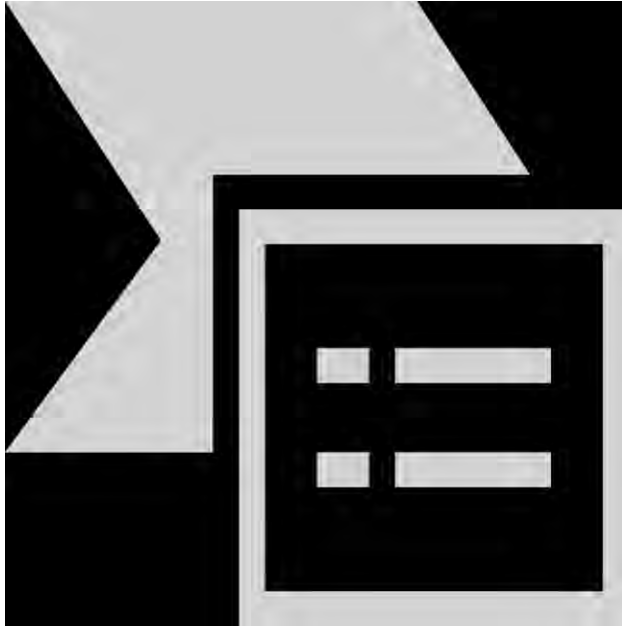
ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

1.4.1. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ

Οι εντεροϊοί είναι μικροί ιοί με εικοσαεδρικά καψίδια χωρίς φάκελο με διάμετρο περίπου 30nm και είναι ανάμεσα στους πρώτους ιούς που μελετήθηκαν με μεγάλη λεπτομέρεια με κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ. Το καψίδιο αποτελείται από 60 ταυτόσημες δομικές μονάδες, όπου η κάθε μια περιέχει ένα αντίγραφο των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών VP1–VP4 (Εικόνα 4–5). Το πρότυπο διαμόρφωσης των πολυπεπτιδίων VP1–VP3 είναι παρόμοιο, σχηματίζοντας μια δομή από οκτώ αντιπαράλληλα β-φύλλα. Περιέργως, μικρές διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στους πολιοϊούς τύπου 1 και 3 (Filman et al., 1989) και δομικές διαφορές ανάμεσα στους CBV-3 (Muckelbauer et al., 1995) οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια του ιοσώματος. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους αντιπροσωπευτικούς εντεροϊούς και στις άλλες υποομάδες καθώς οι δομές δεν είναι γνωστές ακόμα. Η ομοιοπαράθεση των πρωτοταγών δομών, παρόλα αυτά, προτείνει ότι οι κύριες διαφορές εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές θηλιάς που συνδέουν τα β-φύλλα (Pougy et al., 1994). Αυτές είναι επίσης και οι κυριότερες αντιγονικές θέσεις στους πολιοϊούς (Minor et al., 1986).

Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου (Blondel et al., 1998). Τα καρβοξυτελικά άκρα των πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, όπως και οι περισσότερες από τις θηλιές τους, εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του πολιοϊού υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIII A και N-AgIII B. Η N-AgI αντιγονική περιοχή είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90–105 της VP1 πρωτεΐνης. Η N-AgII αντιγονική περιοχή είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221–226 της VP1 πρωτεΐνης και τα αμινοξέα 164–172, 270 της VP2 πρωτεΐνης. Η N-AgIII A αντιγονική περιοχή αποτελείται από τα αμινοξέα 58–60 και 71–73 της VP3 πρωτεΐνης και τέλος η N-AgIII B αντιγονική περιοχή από τα αμινοξέα 76–79 της VP3 πρωτεΐνης και το αμινοξύ 72 της VP2 πρωτεΐνης. Αυτές οι περιοχές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων και έτσι παίζουν ρόλο στην αντιγονική ποικιλομορφία ανάμεσα στους εντεροϊούς (Minor et al., 1986).



Εικόνα 4: Δομική οργάνωση του καψιδίου των εντεροϊών. Α) Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από τα προϊόντα (VP1-VP4) της πρωτεολυτικής διάσπασης της πολυπρωτεΐνης P1. Η επιφάνεια του ιοσώματος σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3, ενώ η VP4 βρίσκεται εσωτερικά. Β) Πέντε πρωτομερή σχηματίζουν το πενταμερές. Παρουσιάζεται ο άξονας πενταεδρικής περιστρεφόμενης συμμετρίας. Γ) Το εικοσαεδρικό καψίδιο σχηματίζεται από δώδεκα πενταμερή. Ένας από τους άξονες τριεδρικής συμμετρίας είναι επισημασμένος (Rueckert et al., 1996).

Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4. Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη και βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου συνδεδεμένη με μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο. Γενικά, η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις. Μια βαθιά αυλάκωση η λεγόμενη canyon, η οποία διαμορφώνεται στην σύνδεση της VP1 με την VP3 και περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας, είναι ιδιαίτερα σημαντική για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, λόγω του μικρού της μεγέθους, δεν επιτρέπει την αναγνώριση των εσωτερικών περιοχών της από τα ογκώδη αντισώματα και έτσι προσφέρει στον ιό μια στρατηγική για την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή (Stanway et al., 1990). Δεύτερον, φέρει στο εσωτερικό της, κατάλληλες περιοχές που μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή και έτσι μπορεί ο ιός να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Blondel et al., 1998).



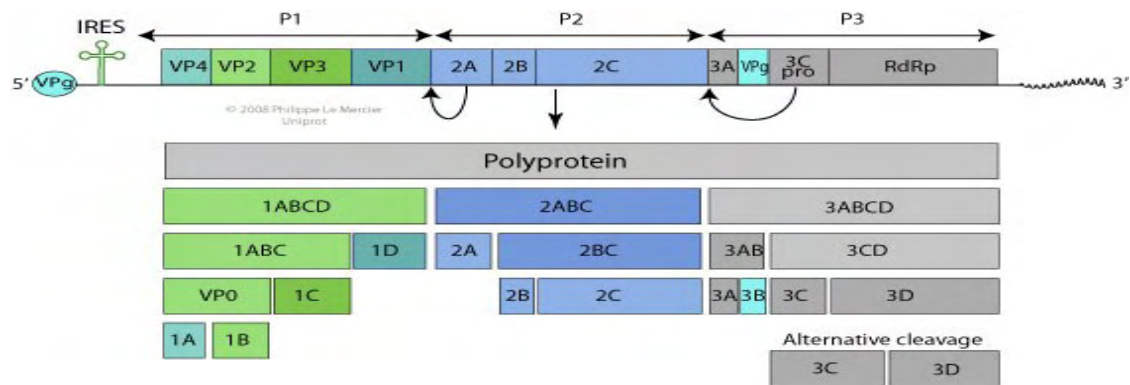
Εικόνα 5: Το καψίδιο των εντεροϊών περιβάλλει το RNA γονιδίωμα. Το καψίδιο δεν περιβάλλεται από φάκελο, είναι σφαιρικό και διαμέτρου περίπου 30nm. Αποτελείται από 60 πρωτομερή που πακετάρονται πυκνά και με εικοσαεδρική συμμετρία (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html).

1.4.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

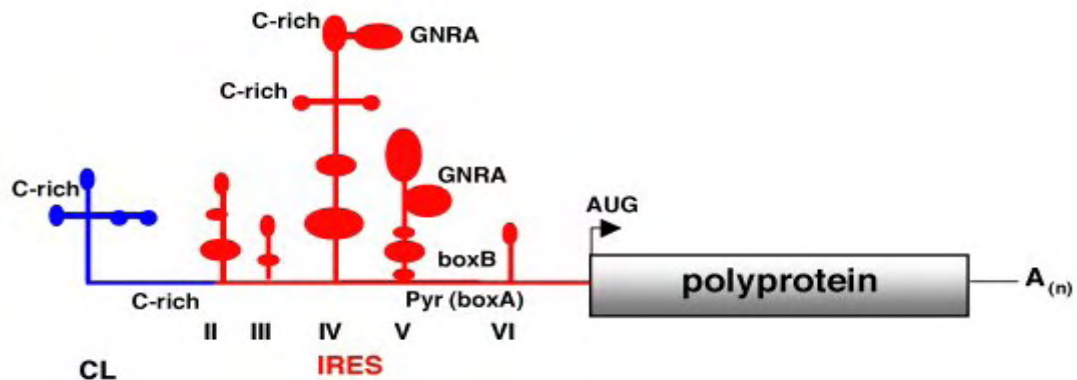
Στο γονιδίωμα των εντεροϊών διακρίνονται τρεις κύριες περιοχές: η 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR) που αποτελείται από 750 νουκλεοτίδια, το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) (Εικόνα 5). Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας με μήκος περίπου 7.500 νουκλεοτίδια. Η συνολική οργάνωση του γονιδιώματος παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Το RNA είναι πολυαδενυλιωμένο και περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη.

Στο άκρο της 5' μη κωδικής περιοχής αντί για την ύπαρξη μεθυλιωμένου νουκλεοτιδίου (καλύπτρα), είναι προσδεμένη μια μικρή ιϊκή πρωτεΐνη, η VPg. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της 5'- τελικής μονοφωσφορικής ομάδας του ιϊκού γονιδιώματος με το τελικό νουκλεοτίδιο ουρακίλης του RNA και με ένα κατάλοιπο τυροσίνης της πρωτεΐνης VPg. Η 5' αμετάφραστη περιοχή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μετάφρασης καθώς περιέχει συντηρημένα τμήματα που σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές. Συγκεκριμένα παίζει ρόλο στον εγκλεισμό του ιού στο καψίδιο καθώς και στον πολλαπλασιασμό του. Αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία και διαιρείται σε τρία επιμέρους τμήματα (φουρκέτες): την περιοχή cloverleaf (domain I), την περιοχή IRES (Internal Ribosomal Entry Site-Εσωτερική Θέση Πρόσδεσης του Ριβοσώματος) και την περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Η δομή σχήματος τριφυλλιού cloverleaf (domain I) είναι ένα γενετικό στοιχείο με cis-δραστικότητα και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας (Witwer et al., 2001) (Εικόνα 7). Το τελευταίο

τμήμα της 5' μη κωδικής περιοχής περιέχει το κωδικόνιο AUG υπεύθυνο για την έναρξη της μετάφρασης. Το IRES είναι ένα στοιχείο με cis-δραστικότητα, περιλαμβάνει διακριτές περιοχές (domain II–VI) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης (Εικόνα 7). Αυτό συμβαίνει καθώς το ριβόσωμα προσδένεται απευθείας σε αυτή την εσωτερική περιοχή του γενώματος του ιού και ξεκινάει τη μετάφραση. Στην περιοχή του 5' UTR υπάρχουν περιοχές που είναι συντηρημένες ανάμεσα στους εντεροϊούς και χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της μόλυνσης από εντεροϊό αλλά όχι για την ταυτοποίηση του ορότυπου. Αντίθετα περιοχές που προέρχονται από την καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 συνδέονται με τον ορότυπο και δίνουν την δυνατότητα μοριακής ταυτοποίησης του (Iturriza-Gómara M et al., 2006).



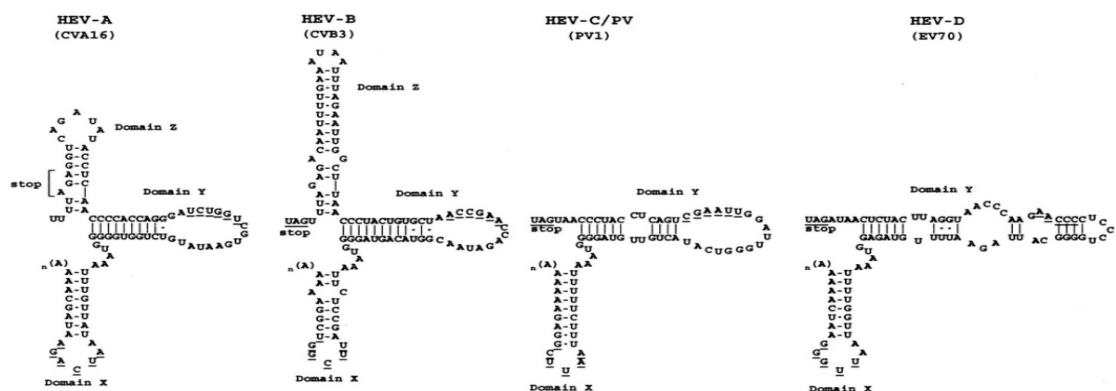
Εικόνα 6: Το ιϊκό μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας των εντεροϊών με μήκος από 7.2 έως 8.5 kb. Το RNA είναι πολυαδενυλιωμένο και περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη. Το ιϊκό RNA στο 5' άκρο αντί για ένα μεθυλιωμένο νουκλεοτίδιο για κάλυμμα έχει μια ιϊκή πρωτεΐνη, την VPg. Το μακρύ 5' UTR στο άκρο του γονιδιώματος περιέχει μια εσωτερική θέση έναρξης του ριβοσώματος τύπου 1. Οι περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν για τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού που σχετίζονται με την αντιγραφή. Το 3'UTR είναι σημαντικό για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του RNA (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της 5' UTR των εντεροϊών. Παρουσιάζονται οι κύριες δομές στην περιοχή του 5' UTR και οι σχετικές θέσεις των μοτίβων μέσα στο IRES (περιοχή με κόκκινο) τύπου I και η περιοχή cloverleaf (CL) (με μπλε). Οι δομές του IRES είναι αριθμημένες (II έως VI) (Olga Fernández-Miragall, 2009).

Το mRNA των εντεροϊών κωδικοποιεί ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 247 kDa, από το οποίο μέσω μιας διαδικασίας πρωτεολύσης παράγονται οι πρωτεΐνες του ιού. Η κωδική περιοχή του ιϊκού RNA αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, τη δομική και τη μη-δομική. Μετά την πρωτεολύση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν τα πρόδρομα πολυπεπτίδια P1, P2 και P3. Η περιοχή P1 αντιστοιχεί στη δομική περιοχή του πολυπεπτιδίου κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του ιού που σχηματίζουν το καψίδιο (VP1, VP2, VP3 και VP4). Οι περιοχές P2 και P3 αποτελούν την μη-δομική περιοχή του πολυπεπτιδίου και κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D και τα λειτουργικά ενδιάμεσα (2BC, 3AB, 3CD) (Εικόνα 6).

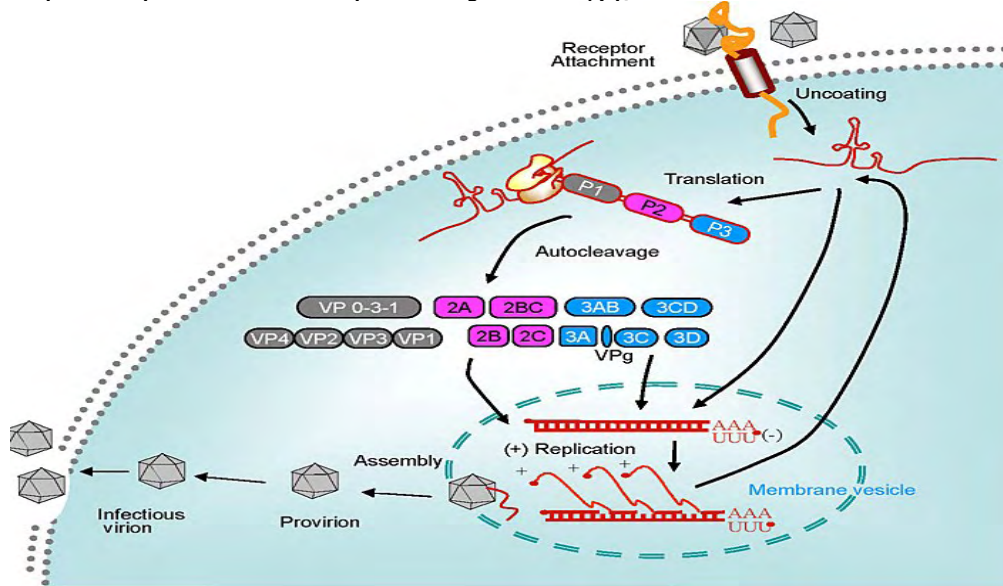
Τέλος, η 3' μη κωδική περιοχή ποικίλει μεταξύ των εντεροϊών. Για το λόγο αυτό διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση την αλληλουχία του 3'UTR. Η πρώτη κατηγορία είναι αυτή των πολιοϊών, η οποία περιλαμβάνει και τον ιό coxsackie A21 και τους εντεροϊούς των βοοειδών. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι Coxsackie B ιοί, οι ιοί swine vesicular disease, ο Coxsackie A9 και οι Echo ιοί. Στην πρώτη ομάδα το μήκος της 3'UTR είναι περίπου 72 νουκλεοτίδια, ενώ στην δεύτερη είναι περίπου 100 νουκλεοτίδια. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ομάδων έγκειται στο ότι υπάρχει μία χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς, η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιϊκού γενώματος στους ιούς Coxsackie B, η οποία απουσιάζει από τους πολιοϊούς (Jacobson et al., 1993). Στο τέλος της περιοχής με δομή θηλιάς υπάρχει μια πολυαδενυλιωμένη ουρά μήκους περίπου 60 νουκλεοτιδίων, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο το ιϊκό RNA και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιϊκού γενώματος (Fields B, Knipe D and Howley P, 2007) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Σύγκριση των πιθανών δευτεροταγών δομών των 3' UTR των εντεροϊών (τροποποιήθηκε από Andi Krumbholz et al., 2002).

1.4.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Τα βασικά στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών είναι: 1) Πρόσδεση του καψιδίου του ιού σε ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς και η είσοδος του ιού στο κύτταρο, 2) Απελευθέρωση του μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, 3) Μετάφραση του γονιδιώματος των εντεροϊών και παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών, 4) Αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού, 5) Συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων και 6) Έξοδος των νέων ιοσωμάτων από το κύτταρο. Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται σχηματικά τα στάδια αυτά.

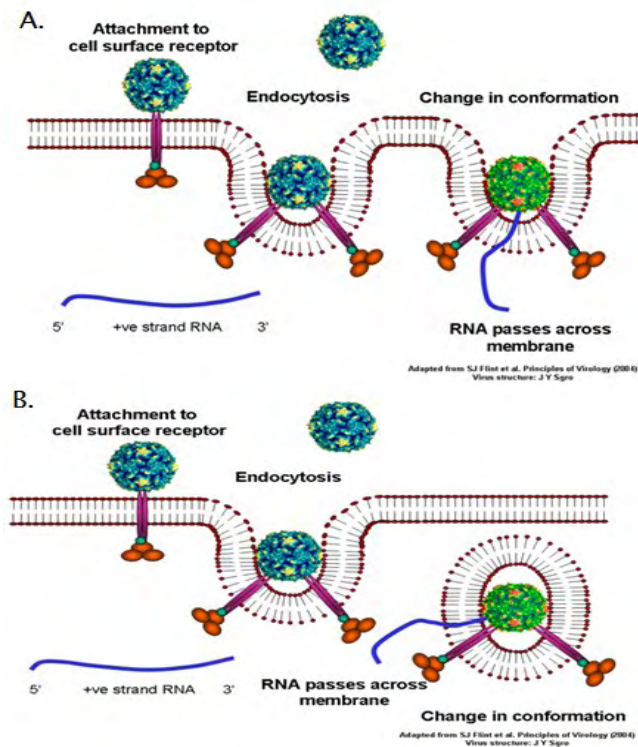


Εικόνα 9: Κύκλος ζωής των εντεροϊών (Travis Lim, 2008).

1.4.3.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Για να εισέλθει ο εντεροϊός στο κύτταρο ξενιστή πρέπει να συνδεθεί σε ειδικούς υποδοχείς ή/και συνυποδοχείς. Οι περισσότεροι κυτταρικοί υποδοχείς συνδέονται σε περιοχές που εντοπίζονται στις αύλακες της επιφάνειας των καψιδίων των εντεροϊών. Συγκεκριμένα, συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP4 στη σχηματιζόμενη αύλακα συνδέονται με υποδοχείς που έχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Rossmann et al., 1994). Για τους εντεροϊούς έχουν προταθεί δυο μοντέλα διείσδυσης στο κύτταρο ξενιστή: Α) μέσω ενδοκύττωσης και αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 10Α) και μέσω ενδοκύττωσης, εγκλεισμού του νουκλεοκαψιδίου στο ενδόσωμα, αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα μέσω

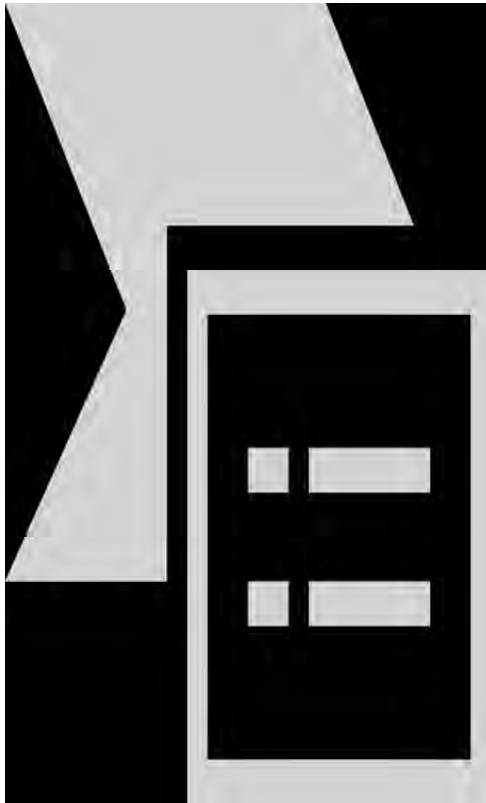
του ενδοσώματος (Εικόνα 10B). Σημειώνεται πως σε μερικές περιπτώσεις οι αλλαγές αυτές επάγονται από τον ίδιο τον υποδοχέα. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα (Flint et al., 2004).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των δυο μοντέλων διείσδυσης των εντεροϊών στο κύτταρο ξενιστή (Flint et al., 2004).

Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μία μεγάλη ποικιλία υποδοχέων και μηχανισμών εισόδου προκειμένου να εισβάλουν στο κύτταρο ξενιστή κάτι που επηρεάζει την είσοδο του κάθε ιού σε διαφορετικό τύπο κυττάρου ξενιστή. Οι ιντεγκρίνες χρησιμοποιούνται σαν υποδοχείς από κάποιους picornaviruses. Οι picornaviruses που συνδέονται σε ιντεγκρίνες, όπως οι CAV9 (Roivainen et al., 1994) και EV9 (Birch GM et al., 1995) έχουν ένα μοτίβο RGD στην καψιδιακή πρωτεΐνη VP1 που λειτουργεί ως θέση σύνδεσης (Chang et al., 1992, Fox et al., 1989) (Πίνακας 2). Η πρωτεΐνη Glucose-regulated 78 (GRP78, ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ-70), είναι ο συνυποδοχέας των CAV9 (Triantafilou et al., 2002) ενώ η τάξη I MHC (Triantafilou et al., 2002) και η $\beta 2$ μικροανοσοσφαιρίνη (Triantafilou et al., 1999, Heikkilä et al., 2010) συμμετέχει στην ενδοκυτταρική επεξεργασία του ιού. Η $\alpha 2 \beta 1$ integrin λειτουργεί ως υποδοχέας για τον EV1 (Bergelson et al., 1992, Bergelson et al., 1993, Ohman et al., 2001). Η $\alpha 2 I$ δομική περιοχή μπορεί να υπάρξει σε ανοιχτή και κλειστή διαμόρφωση (Emsley et al., 2000). Ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR; CD155) και ο υποδοχέας των coxsackievirus adenovirus (CAR), το ICAM-1 (CD54) είναι μέλη των IgSF και λειτουργούν ως

υποδοχείς για πολλούς picornaviruses, όπως οι PVs, οι CBVs και CAVs (Πίνακας 2).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων που έχει αναφερθεί ότι λειτουργούν ως υποδοχείς των picornavirus. Οι δομικές περιοχές Ig-like, SCR-like ή LDL-like εμπλέκονται στην σύνδεση του ιού και είναι σημασμένες με μαύρο. Οι δομικές περιοχές που παρουσιάζονται χωρίς γέμισμα δεν εμπλέκονται στην σύνδεση του ιού. Οι περιοχές για τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία παρουσιάζονται με γκρι χρώμα. (CAR, coxsackie-adenovirus υποδοχέας; DAF, decay-accelerating παράγοντας; GPI, glycosyl- phosphatidylinositol; HAVcr-1, κυτταρικός υποδοχέας ηπατίτιδας τύπου 1; ICAM-1, intracellular adhesion molecule type 1; LDL, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας; LDLR, υποδοχέας λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας; PVR, υποδοχέας πολιοϊών; SCR, short consensus repeat; T/S/P, θρεονίνη/σερίνη/προλίνη; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule type 1. (David J Evans, 1998).

Ο υποδοχέας CAR λειτουργεί ως κυτταρικός υποδοχέας των CBVs (Bergelson et al., 1997, Tomko et al., 1997). Έχει δυο IgSF δομικές περιοχές (Εικόνα 11) και εντοπίζεται στις διακυτταρικές θέσεις επαφής τις συνδέσεις των επιθηλιακών κυττάρων, αλληλεπιδρώντας έτσι με την ρύθμιση της ροής των ιόντων και μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων και των ιών, κατά μήκος των κυττάρων (Cohen et al., 2001). Επιπλέον των ιντεγκρινών και των υποδοχέων IgSF, οι picornaviruses μπορούν να χρησιμοποιήσουν και κάποιους άλλους υποδοχείς, όπως ο decay-accelerating factor (DAF) (εντεροϊός 70 και CAV21, CBV 1, 3 and 5), τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (VLDL-R), heparan sulphate (HS), σιαλικά οξέα και τη β2 μικροσφαιρίνη (β2-m) (Bergelson et al., 1994, Clarkson et al., 1995, Powell et al., 1998, Ward et al., 1994, Bergelson et al., 1995, Shafren et al., 1995) (Πίνακας 2).

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	ΣΥΝ-ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	ΙΟΣ
Integrins		
α2β1 integrin	B2-Microglobulin	Echovirus 1
ανβ3 integrin		Echovirus 25, 30, 32; Cocksackievirus A9
ανβ6 integrin		Cocksackievirus A9
ανβ1 and ανβ3 integrin		Human parechovirus 1
ανβ1, ανβ3, ανβ6, ανβ8 and α5β1		Foot-and-mouth disease virus

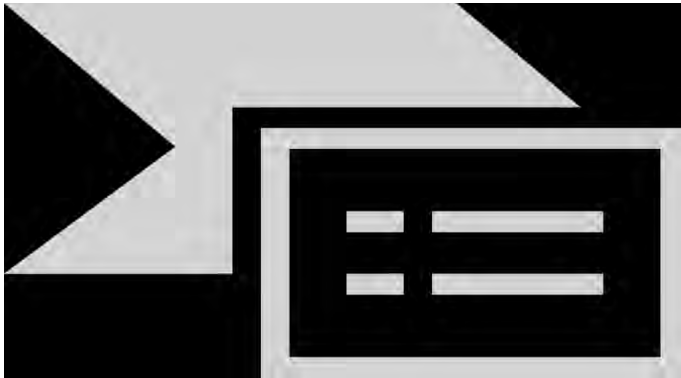
integrin		
IgSF-like		
Poliovirus receptor, PVR; CD155,		Polioviruses
Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1; CD54		Coxsackieviruses A13, A18, A21, Major receptor group of rhinoviruses
Coxsackievirus-adenovirus receptor, CAR		Coxsackieviruses B1–B6
HAV cellular receptor 1, HAVcr-1		Hepatitis A virus
SRC-like		
Decay-accelerating factor, DAF; CD55	ICAM-1, ανβ6-integrin	Coxsackieviruses A21; Echoviruses 3, 6, 7, 11–13, 20, 21, 24, 29, 30 Enterovirus 70 Coxsackieviruses B1, B3, B5
Others		
Sialic acid		Enterovirus 70, 71, Rhinovirus 87
Heparan sulphate		Foot-and-mouth disease virus(culture adapted), Certain echovirus serotypes
Low-density lipoprotein receptor; LDL-R		Minor receptor group of rhinoviruses
β2 microglobulin, β2m		Certain echovirus serotypes Coxsackievirus A9
Glucose-regulated protein 78		Coxsackievirus A9
Scavenger receptor class B, member 2, SCARB2		Enterovirus 71
SA-linked glycans		Enterovirus 71

Πίνακας 2: Παραδείγματα των κυτταρικών υποδοχέων των *picornavirus* (Joki-Korpela et al., 2001, Racaniello, 2001, Williams et al., 2004, Ruiz-Saenz et al., 2009, Triantafilou et al., 2002, Yamayoshi et al., 2009, Yang et al., 2009, Ylipaasto et al., 2010).

1.4.3.2. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ RNA ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Το γονιδίωμα των εντεροϊών δεν μπορεί να αναγνωριστεί από τα ριβοσώματα κατά το συνήθη τρόπο καθώς φέρει την πρωτεΐνη VPg αντί της καλύπτρας στο 5' άκρο. Με την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα, πραγματοποιείται απομάκρυνση της VPg από το 5' άκρο του γονιδιώματος, από μια κυτταρική πρωτεάση. Με τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES (μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης) ξεκινά η μετάφραση. Σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs) είναι απαραίτητοι για την έναρξη της μετάφρασης στους εντεροϊούς, με μοναδική εξαίρεση τον παράγοντα eIF4E, ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα. Η θέσεις πρόσδεσης των eIFs δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Πιθανά, η πρόσδεσή τους να γίνεται κυρίως στην περιοχή V του στοιχείου IRES καθώς κάθε μετάλλαξη που επηρεάζει τη δομή αυτή καθιστά το IRES μη-λειτουργικό (Ochs et al., 2002). Το μοντέλο που έχει προταθεί μέχρι τώρα είναι ότι κατά την μετάφραση του ιϊκού RNA, ο eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το IRES και κατόπιν συνδέεται με τον παράγοντα eIF4A προάγοντας τη συναρμολόγηση του 48S συμπλόκου. Τελικά, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αφού προσδεθεί στο mRNA κινείται κατά μήκος

του ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης AUG (Prevot et al., 2003). Στο IRES των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν την μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιϊκού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί trans-acting παράγοντες (ITAFs). Τέσσερις από αυτούς είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: PTB (polypyrimidine tract-binding protein), PCBP2 (poly(rC)-binding protein 2), το αυτοαντιγόνο La και η Unr η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ανοδικά του N-ras. Τέλος, ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF45, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Ochs et al., 2002, Boussadia et al., 2002).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού μετάφρασης των εντεροϊών (<http://www.hunter.cuny.edu/chemistry/faculty/Dixie/goss-group-1/protein-rna-interactions-protein-synthesis-in-viral-systems-and-plants>).

1.4.3.3. ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Από το ανοικτό αναγνώστικό πλαίσιο των εντεροϊών παράγεται μια πολυπρωτεΐνη 247 KDa, η οποία επεξεργάζεται από τις πρωτεάσες του ιού, 2Apro, 3Cpro και 3CDpro. Η πρωτεόλυση από τις 3Cpro και 3CDpro πρωτεάσες πραγματοποιείται ανάμεσα σε γλουταμίνη και γλυκίνη. Αντίθετα η 2Apro πρωτεολύει τους δεσμούς τυροσίνης και γλυκίνης. Η πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Αρχικά, η 2Apro πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού τυροσίνης και γλυκίνης στο δικό της N-τελικό άκρο, κάτι που προκαλεί την απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης P1. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η απελευθέρωση της P3 από το πρόδρομο πολυπεπτίδιο P2- P3, μέσω cis-διάσπασης από την πρωτεάση 3CDpro. Τέλος διαδοχικές trans-διασπάσεις από την 3CDpro πρωτεάση, οδηγούν στην απελευθέρωση των μη-δομικών πρωτεϊνών 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B, 3Cpro και 3Dpro και των δομικών πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3. Κατά την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων, η VP0 διασπάται (πιθανά μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού) και παράγει τις VP4 και VP2. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για την

παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων και αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης (Pfister et al., 1999).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης την εντεροϊών ([http:// pathmicro .med. sc. edu/ virol/ polio.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/virol/polio.htm)).

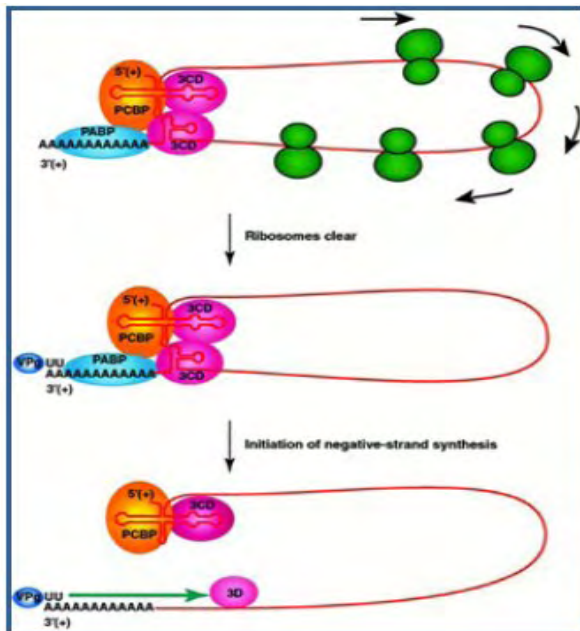
1.4.3.4. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ RNA ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η διαδικασία της αντιγραφής είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και πραγματοποιείται στα μεμβρανικά κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου ξενιστή. Το βασικό ένζυμο που καταλύει την αντιγραφή του γονιδιώματος των εντεροϊών είναι η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (3Dpol). Η 3Dpol εξαρτάται από την παρουσία ενός εκκινητή και καταλύει τη σύνθεση των αρνητικών και θετικών κλώνων RNA. Το ένζυμο αυτό έχει δυο δραστηριότητες. Η μια είναι η επιμήκυνση των RNA κλώνων χρησιμοποιώντας το κατάλληλο εκμαγείο. Η δεύτερη είναι η ουριδιλίωση της VPg ιικής πρωτεΐνης (Paul et al., 1998). Ως εκκινητής χρησιμοποιείται η ουριδιλιωμένη σε ένα κατάλοιπο τυροσίνη VPg πρωτεΐνη (VPg-pU-pU). Ως εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg, χρησιμοποιείται μία συντηρημένη αλληλουχία ¹GXXXAAACXXXXXA¹⁴ (cre) η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας του RNA. Η VPg πρωτεΐνη εμπλέκεται στην σύνθεση του θετικού κλώνου του RNA.

Κατά τη μετάβαση από τη μετάφραση στη σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας του RNA, η περιοχή 5'cloverleaf και η πολύ-A ουρά στο 3' άκρο αλληλεπιδρούν, με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του θετικού κλώνου του RNA (Εικόνα 14). Η πρωτεΐνη 3CDpro προσδένεται στην κυτταρική πρωτεΐνη PABP (poly(A) binding protein) και με τον τρόπο αυτό ενισχύει πιθανά την κυκλοποίηση του RNA, μέσω αλληλεπίδρασης του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου 3AB/3CDpro/PCBP2 (RNP) στην

περιοχή cloverleaf του 5' άκρου και της PABP στην περιοχή της πολύ-A ουράς στο 3' άκρο (Herols J and Andino R, 2001).

Η αντιγραφή του ιϊκού RNA προχωράει μέσω του ακόλουθου μονοπατιού: το εισερχόμενο γενωμικό RNA θετικής πολικότητας χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας RNA. Προκύπτει η μορφή του δίκλωνου RNA (RF). Ακολουθεί η σύνθεση του θετικού κλώνου από τον αρνητικό (Wimmer et al., 1993). Στο μολυσμένο κύτταρο υπάρχουν 50 φορές περισσότεροι θετικοί κλώνοι RNA σε σύγκριση με τους αρνητικούς κλώνους RNA. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης αντιγραφής κατά την οποία είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνθεση πολλαπλών θετικών κλώνων RNA από έναν μόνο αρνητικό κλώνο RNA (Morasco et al., 2003).



Εικόνα 14: Μοντέλο κυκλοποίησης του ιϊκού RNA κατά την σύνθεση του RNA(-).

1.4.3.5. ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΞΟΔΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η καψιδίωση του ιϊκού RNA είναι συζευγμένη με τον μηχανισμό αντιγραφής του. Και οι δυο διαδικασίες πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων, που επάγονται από τον ιό (Ansaardi et al., 1996). Η συναρμολόγηση του ιϊκού καψιδίου ξεκινά με την πρωτεολυτική διάσπαση του πρόδρομου πολυπεπτιδίου P1 από την ιϊκή πρωτεάση 3CDpro. Με τον τρόπο αυτό παράγονται οι πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά δώδεκα πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al., 1999). Η

ενκαψιδίωση του ιϊκού γονιδιώματος πραγματοποιείται είτε με τη συσσωμάτωση των πενταμερών γύρω από το ιϊκό RNA είτε με την είσοδο του ιϊκού RNA μέσα στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου. Το τελικό βήμα είναι η διάσπαση της VP0 στις πρωτεΐνες VP2 και VP4, πιθανά με ένα αυτοκαταλυτικό μηχανισμό, και έτσι σταθεροποιείται το καψίδιο και το προκαψίδιο μετατρέπεται σε ένα ώριμο, μολυσματικό ιοσωμάτιο και εξέρχεται από το κύτταρο (Hogle et al., 2002).

1.5. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.5.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Υπάρχουν δύο βασικά φαινόμενα τα οποία ευθύνονται για την εξέλιξη των εντεροϊών: οι μεταλλάξεις και ο ανασυνδυασμός. Η εμφάνιση μεταλλάξεων είναι αρκετά πιο συχνή στους RNA ιούς σε σχέση με τους DNA ιούς. Αυτή η αυξημένη τάση συσσώρευσης μεταλλάξεων στους RNA ιούς οφείλεται σε δύο πολύ βασικούς λόγους: στη χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών (Domingo et al., 1985). Η χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης οδηγεί σε συχνή ενσωμάτωση λάθος νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Η συχνότητα λάθους υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής. Αυτά τα λάθη που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του ιού δεν μπορούν να διορθωθούν λόγω απουσίας των κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών. Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων οδηγεί στη δημιουργία των quasi-species.

Στο γονιδίωμα των εντεροϊών παρατηρούνται πολύ συχνά σημειακές μεταλλάξεις. Οι σημειακές μεταλλάξεις διακρίνονται σε δύο τύπους ανάλογα με τη φύση της αλλαγής που συμβαίνει από την αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Ο πρώτος τύπος, είναι η μετάπτωση (transition) κατά την οποία μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη, ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ζεύγους G-C με ένα ζεύγος A-T και αντίστροφα. Ο δεύτερος τύπος είναι η μεταστροφή (transversion) κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα, έτσι ώστε ένα ζεύγος A-T να μετατρέπεται σε T-A ή C-G. Στους πολιοϊούς η πιο συχνά παρατηρούμενη μετάλλαξη είναι A→G ενώ μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι σπάνιες.

Γενικά οι λυτικοί ιοί εμφανίζουν έναν υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων ο οποίος για παράδειγμα στους πολιοϊούς φτάνει τις $6,3 \times$

10^{-4} μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής (Domingo et al., 1985). Υπάρχουν δύο μηχανισμοί για την επικράτηση της μετάλλαξης: η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή. Συνήθως οι μεταλλάξεις που φέρουν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα επικρατούν στα πλαίσια της φυσικής επιλογής. Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ιικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη.

Ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του ιικού RNA. Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Επίσης, δευτεροταγείς δομές του ιικού RNA που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή όπως οι δομές cloverleaf και CRE ή το IRES συσσωρεύουν ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Μάλιστα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους (Stanway et al., 1990).

1.5.2. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Ο ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα συν-μολυσμένα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου (homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic). Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στη διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου, ii) συμβάλλει στη δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση και iii) επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους. Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό, ο αντιγραφικός και ο μη αντιγραφικός. Σύμφωνα με τον αντιγραφικό μηχανισμό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά

σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιϊκό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός παρατηρείται στα περισσότερα βιώσιμα ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία έχουν ανασυνδυαστεί μέσα στην κωδική περιοχή τους. Αντίθετα, μία μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π. χ σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιϊκού γενώματος. Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των αρνητικών RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους : i) η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι RNA θετικοί κλώνοι σε σύγκριση με τους αρνητικούς RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο μολυσμένο κύτταρο, ii) οι αρνητικοί κλώνοι RNA βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία (Simmonds and Welch, 2006).

Σύμφωνα με το μη-αντιγραφικό μηχανισμό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από τη σύνδεση προστιθέμενων RNA τμημάτων προερχόμενων από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Θεωρητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκύπτουν αυτά τα RNA τμήματα: i) από την πρώιμη λήξη της μετάφρασης, ii) από την αποικοδόμηση του ιϊκού RNA από κυτταρικές RNases, iii) από δραστηριότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιϊκού RNA. Αν και το γένωμα των πολιοϊών φέρει απαραίτητα μοτίβα ολιγονουκλεοτιδίων, μία διαμόρφωση χαρακτηριστική των ριβοενζύμων (hammerhead) είναι μεν απίθανη αλλά δυνατή. Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστηριότητα ριβοενζύμου (Simmonds and Welch, 2006).

1.5.3. QUASISPECIES ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο ιός άγριου τύπου στην πραγματικότητα αποτελεί μια παροδική πλειοψηφία η οποία κυριαρχεί στον συνολικό πληθυσμό των γενωμάτων του ιού (Freistadt et al., 2007). Αυτά τα μίγματα των μοριακών παραλλαγών (variants) είναι γνωστά ως quasispecies. Δηλαδή, όπως δηλώνει και το όνομά τους, τα quasispecies είναι το σύνολο των σχετικών στοιχείων που συμπεριφέρονται σχεδόν (quasi) σαν ένα είδος (species). Η ύπαρξη των quasispecies ή των γενοτυπικών παραλλαγών στους ιϊκούς πληθυσμούς, εξαιτίας των λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή

του ιού, αποτελεί έναν ακόμη βασικό παράγοντα όσον αφορά την εισβολή στο ΚΝΣ. Λάθη προκύπτουν από τη χαμηλή πιστότητα της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, μέσω της οποίας τουλάχιστον ένα λάθος νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται ανά γονιδιακό διπλασιασμό καθώς και από άλλους παράγοντες που εμπλέκονται με την ιϊκή αντιγραφή. Για παράδειγμα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα *in vitro* με την 3Dpol των πολιοϊών έδειξε ότι η πιστότητα της αντιγραφής είναι ενδεχομένως σχετικά υψηλή· ωστόσο άλλα γεγονότα κατά την αντιγραφή όπως η αλλαγή μήτρας, ίσως να είναι αυτά που πραγματικά συνεισφέρουν στα λάθη που εντοπίζονται στο γένωμα (Freistadt et al., 2007).

Ανεξάρτητα της φύσης του ρυθμού μετάλλαξης, η ύπαρξη ενός πληθυσμού ιϊκών παραλλαγών, ή ένα πλήθος *quasispecies*, έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει στην εξάπλωση των εντεροϊών στο ΚΝΣ. Κατά τη διάρκεια μιας πρόσφατης έρευνας, χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή πολιοϊού ο οποίος κωδικοποιούσε μια μεταλλαγμένη 3DPol που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια σειριακών περασμάτων παρουσία ριμπαβιρίνης (στέλεχος G64S). Με αυτή την έρευνα αποκαλύφθηκε η κρίσιμη φύση των ιϊκών *quasispecies* όσον αφορά την εισβολή των εντεροϊών στο ΚΝΣ. Ο πολιοϊός που απομονώθηκε βρέθηκε να αυξάνει την πιστότητα της ιϊκής πολυμεράσης και να μειώνει την ποικιλία των *quasispecies*. Το στέλεχος G64S ήταν λιγότερο νευρομολυσματικό απ' ό,τι ο ιός αγρίου τύπου, και η εισβολή στο ΚΝΣ απέτυχε να συμβεί εκτός εάν το απομονωθέν στέλεχος συν-εμβολιαζόταν σε συνδυασμό με ένα ποικιλόμορφο πληθυσμό *quasispecies* (Vignuzzi et al., 2006). Αυτά τα αξιοπερίεργα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η συνεργασία/αλληλεπίδραση μεταξύ των παραλλαγών μέσα σε έναν ιϊκό πληθυσμό είναι απαραίτητη για την εισβολή στο ΚΝΣ και την επερχόμενη νευροπαθολογία. Η συνεργασία των ιϊκών γενοτύπων μπορεί να πραγματοποιείται για αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης και ταυτόχρονη εισβολή στο ΚΝΣ.

Γενετικά ανασχετικά γεγονότα, παρατηρήθηκαν και καθώς τα παραλλάγματα των ιών εισέβαλαν στο ΚΝΣ. Καθώς οι ιοί διαπερνούν τις οδούς για το ΚΝΣ, οι αποκρίσεις έναντι των ιών ξεκινούν με το μπλοκάρισμα της εισόδου για τα εναπομείναντα παραλλάγματα ιών (Pfeiffer et al., 2006). Αυτό το γενετικό ανασχετικό γεγονός γνωστό ως μοντέλο “φλεγόμενη γέφυρα” (“burned bridge”), ενδεχομένως συνεισφέρει στη σποραδική μεταφορά των πολιοϊών στο ΚΝΣ το οποίο συμβαίνει στο 1–2% των περιπτώσεων (Gromeier et al., 1998). Μετέπειτα μελέτες πρόσθεσαν στο μοντέλο “φλεγόμενη γέφυρα” (“burned bridge”) την πιθανότητα ύπαρξης πολλαπλών φραγμών οι οποίοι ίσως συνεισφέρουν

στα φαινόμενα γενετικής ανάσχεσης των *quasispecies*. Αυτοί οι φραγμοί οι οποίοι ίσως περιορίζουν τη νευρομολυσματικότητα περιλαμβάνουν την ακεραιότητα (integrity) του εντέρου, την έναρξη μιας προστατευτικής εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης και καθιστούν ανίκανη τη νευρονική μεταφορά του ιού (Kuss et al., 2008; Lancaster και Pfeiffer, 2010). Συνεπώς, η είσοδος των εντεροϊών στον εγκέφαλο φαίνεται να είναι μία περίπλοκη αλληλεπίδραση, όχι μόνο μεταξύ του ιού και του ξενιστή, αλλά και μεταξύ των παραλλαγών του ιού μέσα στον πληθυσμό των *quasispecies* (Roades et al., 2011).

1.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί είναι κυτταρολυτικοί και πολλές από τις νόσους που προκαλούν είναι αποτέλεσμα της καταστροφής των κυττάρων του συγκεκριμένου ιστού. Οι λοιμώξεις είναι γενικά από ασυμπτωματικές έως ήπιες και οι εντεροϊοί θεωρούνται μη σημαντικοί ως ανθρώπινα παθογόνα. Εντούτοις, οι εντεροϊοί μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές, έως θανατηφόρες νόσους.

Η μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊούς σχετίζεται με οξεία χαλαρή παράλυση (acute flaccid paralysis) (Solomon et al., 2003), οξεία χαλαρή μυελίτιδα (acute disseminating myelitis) και οξεία εγκάρσια μυελίτιδα (acute transverse myelitis) (Agin et al., 2010, Minami et al., 2004). Η άσηπτη μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα μπορούν επίσης να προκύψουν από μόλυνση με εντεροϊούς (Dalwai et al., 2010., Lewthwaite et al., 2010). Περαιτέρω στοιχεία υποδεικνύουν την εκτεταμένη εξάπλωση και την ποικιλία των εντεροϊών που σχετίζονται με ανθρώπινη νόσο (Victoria et al., 2009). Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις υπέδειξαν την παρουσία κυκλοφορούντων ανθρώπινων εντεροϊών τύπου A (HEV-A) και HEV-C, συμπεριλαμβανομένων και άλλων μελών των ιών Picornaviridae, όπως P-ECHO-Vs, ρινοϊοί, και ανθρώπινοι *cardioviruses* σε παιδιά στη Νότια Ασία, που πάσχουν από οξεία χαλαρή παράλυση (Rhoades et al., 2011).

1.6.1. ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί είναι νευροτρόποι ιοί, άλλα κάθε μέλος του ιϊκού αυτού γένους στοχεύει σε διαφορετικές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Πίνακας 2). Μια πρόσφατη μελέτη *in vivo* από τον Nagata και συνεργάτες του (Nagata et al., 2004) αναφέρει τον εντοπισμό των PV και EV-71 ιών μετά από ενδοφλέβια μόλυνση πιθήκων. Οι ερευνητές ταυτοποίησαν αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον PV

κυρίως μέσα στην πυραμιδική οδό του ΚΝΣ, προκαλώντας μια συνολική απώλεια των κινητικών νευρώνων στο πρόσθιο κέρας της σπονδυλικής στήλης. Σε αντίθεση, ο EV 71 επάγει μόνο περιορισμένη βλάβη τόσο στην εξωπυραμιδική όσο και πυραμιδική οδό, αφήνοντας άθικτους πολλούς κινητικούς νευρώνες στο πρόσθιο κέρας της σπονδυλικής στήλης (Nagata et al., 2004). Επιπλέον, οι συγγραφείς απομόνωσαν τον PV από ολόκληρο το ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης της ραχιαίας ρίζας των γάγγλιων και το τρίδυμο. Σε αντίθεση, ο EV-71 δεν μπορεί να απομονωθεί από μία από τις δύο αυτές περιοχές του ΚΝΣ. Αυτά τα αποτελέσματα επεξηγούν το ευρύ φάσμα των νευρωνικών κυττάρων που είναι στόχοι για το PV, σε σύγκριση με τους περιορισμένους νευρωνικούς στόχους του EV-71. Σε άλλο παράδειγμα της νευρωνικής στόχευσης ενός picornavirus, του TMEV, φαίνεται ότι μολύνει αρχικά περιοχές της γκρίζας ουσίας του ΚΝΣ, και ότι ο ιός διατηρείται και επιμένει στην λευκή ουσία μετά από οξεία μόλυνση (Roussarie et al., 2007). Ο Echovirus τύπου 1 (ECHO-1-V) έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί κυτταρικές νεκρωτικές αλλοιώσεις στον εγκεφαλικό φλοιό διαγονιδιακών ποντίκιων που εκφράζουν την ανθρώπινη ιντεγκρίνη late antigen 2, οδηγώντας σε παράλυση (Hughes et al., 2003). Αντίθετα, η πρώιμη CVB3 μόλυνση βρέθηκε να είναι εντοπισμένη σε ειδικές νεκρογενείς περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της υποκοιλιακής ζώνης (SVZ) (Fire et al., 2005). Κάθε μέλος του γένους των εντεροϊών προτιμά σαφώς διακριτές περιοχές του ΚΝΣ. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό ποιοί είναι οι ακριβείς παράγοντες που προκαλούν τον τροπισμό αυτό σε κυτταρικό επίπεδο. Ο τροπισμός στο κυτταρικό επίπεδο, μπορεί να θεωρηθεί ως προς την αλληλεπίδραση τουλάχιστον τριών γενικών παραγόντων: η ικανότητα του ιού να μολύνει και να αναπαράγεται σε συγκεκριμένους ιστούς του ξενιστή, η ικανότητα του κυττάρου-ξενιστή για να καθαρίσει τον ιό, και την ικανότητα του ιού να αποφύγει την κάθαρση από τον ξενιστή. Πιθανά, διαφορές στο εύρος της απόκρισης της ιντερφερόνης- α/β μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τον ιστικό τροπισμό του PV (Ida Hosonuma et al., 2005, Yoshikawa et al., 2006). Ο τροπισμός του PV για νευρώνες έχει προηγουμένως δείχθει να καθορίζεται από την εσωτερική θέση σύνδεσης του ριβοσώματος του PV (IRES) (Kauder et al., 2004).

Ο Kauder και οι συνεργάτες του αρχικά βρήκαν ότι ο τροπισμός των PV στους νευρικούς ιστούς μπορεί να μην εξηγείται πλήρως από όργανο-ειδικές διαφορές στην IRES-μεσολαβούμενη μετάφραση, σε δείγματα που προέρχονταν από ασθενείς που είχαν ίδια ηλικία. Διερευνήθηκαν οι μεταβολές στον τροπισμό του PV με την δημιουργία ανασυνδυασμένων ιών που κατασκευάστηκαν για να περιέχουν το IRES από ανθρώπινο ρινοϊό (Kauder et al., 2006). Με τον τρόπο αυτό, οι ερευνητές

παρατήρησαν IRES–μεσολαβούμενες, όργανο–ειδικές μεταφραστικές διαφορές μεταξύ των εντεροϊών σε λοίμωξη σε ενήλικες σε σχέση με νεογνά. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν σε IRES transacting Factors (ITAFs) που εκφράζονται διαφορετικά σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων (Rhoades et al., 2011).

Ιός	Εντοπισμός στο ΚΝΣ	Κυτταρικοί τύποι που μολύνονται στην οξεία φάση	Κυτταρικοί τύποι που μολύνονται όταν ο ιός επιμένει
Πολιοϊοί	Όλο το ΚΝΣ	Νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδεντροκύτταρα	Νευρώνες
Εντεροϊός –71	ΚΝΣ — άλλα όχι γαγγλία της ραχιαίας ρίζας ή trigemina	Νευρώνες και αστροκύτταρα	Έχει αναφερθεί η επιμονή αλλά είναι άγνωστη η θέση
Coxsackie ιός	Χοριοειδή πλέγματα, φλοιός, νευρογενής περιοχές (SVZ και SGZ), ιππόκαμπος, cortex	Νεστίνη και μυελοειδή κύτταρα, NPSCs, και νευρώνες	NPSCs (σε καλλιέργεια)
TMEV	Σκούρα ουρία (οξεία), λευκή ουσία (επιμονή)	Νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδεντροκύτταρα	Μακροφάγα, μικρογλοία και ολιγοδεντροκύτταρα

Πίνακας 3: Τροπισμός των εντεροϊών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Rhoades et al., 2011).

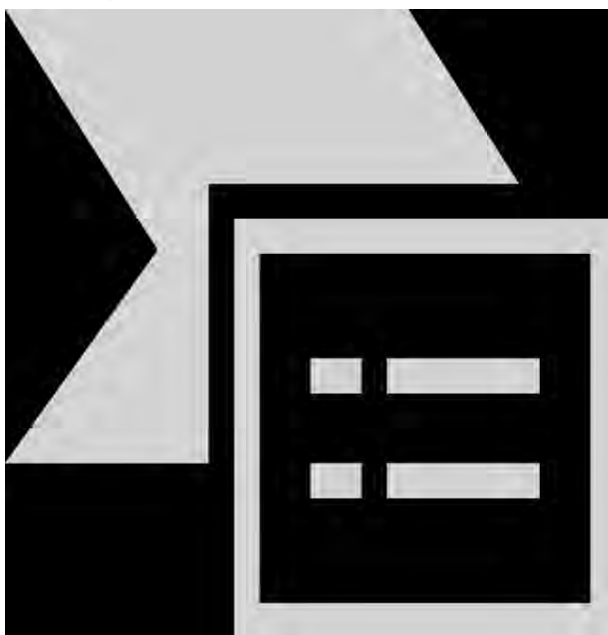
1.6.2. ΠΟΡΕΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι εντεροϊοί εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στο λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος (αμυγδαλές, τραχηλικούς αδένες, μεσεντέριους λεμφαδένες, πλάκες Peyer). Ακολουθεί μικρού βαθμού ιαμμία που προβάλλει κλινικά κακουχία, πυρετό και φαρυγγαλγία και έχει ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση των διαφόρων οργάνων–στόχων από τον ιό, όπως την καρδιά, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, το δέρμα και τους βλεννογόνους. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του στα διάφορα όργανα, ο ιός εισέρχεται πάλι στην κυκλοφορία. Η δεύτερη μεγάλου βαθμού ιαμμία έχει συχνά ως αποτέλεσμα την είσοδο του ιού στο ΚΝΣ (Rhoades et al., 2011).

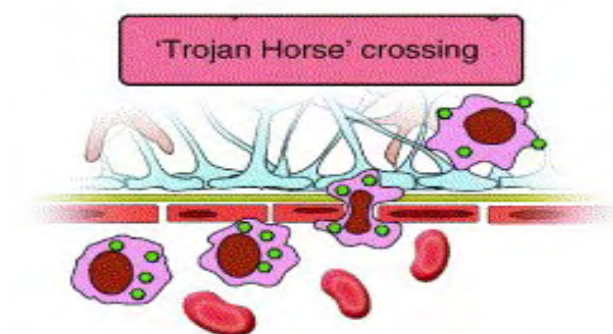
Τα δύο κύρια μοντέλα που αφορούν την είσοδο των πολιοϊών στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν ιαμμία, αφού ο ιός έχει αντιγραφεί στους λεμφοειδείς ιστούς του γαστρεντερικού σωλήνα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το πρώτο μοντέλο πολύ απλά προτείνει την απευθείας κίνηση του ιού διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τον υποδοχέα των πολιοϊών στον άνθρωπο (human

Poliovirus Receptor)(Yang et al., 1997). Ίσως, η άμεση είσοδος δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κατά την αρχική μόλυνση με πολιοϊό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού των οστών (hBMECs, human bone marrow endothelial cells) μπορεί να συμβαίνει στα πρώτα στάδια, και κατά συνέπεια να εξασθενεί ή να εκθέτει (σε κίνδυνο) τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να επιτρέπει στον «δευτερογενή ιό» να εισέλθει στο ΚΝΣ ανεξάρτητα από την έκφραση ενός συγκεκριμένου υποδοχέα. Ένα δεύτερο μοντέλο για την είσοδο των εντεροϊών προτείνει τη διασπορά των πολιοϊών από κάποιον μυ στο ΚΝΣ κατά μήκος νευρικών μονοπατιών (Rean et al., 1992). Αυτά τα νευρικά μονοπάτια καθορίστηκαν σαφέστερα από τους Gromeier και Wimmer το 1998, ως ανελισσόμενη αξονική μεταφοράς του ιού από το μυ που έχει υποστεί φθορά στο ΚΝΣ (Gromeier et al., 1998). Βρέθηκε ότι τραύμα προκαλεί νευρολογική μόλυνση με πολιοϊό, το μοντέλο αυτό χαρακτηριστικά αναφέρεται ως «provocation poliomyelitis».

Ένα άλλο πιθανό μοντέλο της εισόδου των εντεροϊών στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τη χρήση κυττάρων του ανοσοποιητικού μολυσμένων με εντεροϊό τα οποία εισβάλλουν στο ΚΝΣ με έναν τρόπο παρόμοιο του «Δούρειου Ίππου». Βρέθηκε ότι οι πολιοϊοί μπορούν να μολύνουν μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα με έναν hPVR-εξαρτώμενο τρόπο (Freistadt et al., 1993, Wahid et al., 2005). Περεταίρω διερεύνηση αποκάλυψε μία πιθανή σύνδεση μεταξύ της παθογένεσης των πολιοϊών στο ΚΝΣ και της μόλυνσης των μονοκυττάρων, καθώς νευροπαθογόνα στελέχη βρέθηκαν να πολλαπλασιάζονται πιο αποδοτικά στα μονοκύτταρα (Freistadt και Eberle, 1995).



Εικόνα 15: Είσοδος των εντεροϊών και πολλαπλασιασμός στα διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Οι εντεροϊοί εισέρχονται κυρίως από στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Πολλαπλασιάζονται στο λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος. Ακολουθεί αρχική αιμία, που προκαλεί την επιμόλυνση των οργάνων-στόχων. Ο ιός εισέρχεται στην κυκλοφορία και κατά την δεύτερη αιμία εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα ([http:// www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/mech/cases/case28/entero.htm](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/mech/cases/case28/entero.htm))



Εικόνα 16: Πιθανό μοντέλο της εισόδου των εντεροϊών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο εντεροϊός χρησιμοποιεί μολυσμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού (μακροφάγα ή μονοκύτταρα) τα οποία εισβάλλουν στο ΚΝΣ με έναν τρόπο παρόμοιο του «Δούρειου Ίππου» (Anthony N. van den Pol et al., 2006).

1.6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Μετά από μόλυνση με εντεροϊό συχνά επάγεται τερματισμός της μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή. Πολλές από τις ιϊκές πρωτεΐνες έχουν έντονες επιδράσεις στο κύτταρο ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης ρυθμίζοντας την κυτταρική μεταγραφή, τη μετάφραση καθώς και την έκκριση των πρωτεϊνών καθώς και την αυτοφαγία.

Η μεταγραφή του κυττάρου ξενιστή καταστέλλεται από την ιϊκή πρωτεάση 3C, η οποία μεταφέρεται στον πυρήνα από ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή της 3D στην πρόδρομη μορφή της. Επιπλέον, η 3C πρωτεΐνη του EV-71 βρέθηκε πρόσφατα ότι μπλοκάρει την πολυαδενυλίωση του mRNA του ξενιστή (Weng et al., 2009). Επίσης, η ιϊκή πρωτεάση 2A διακόπτει την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση του κυττάρου ξενιστή διασπώντας τον παράγοντα eIF4G, ενισχύει τη μετάφραση του ιϊκού mRNA σταθεροποιώντας τα πολυσώματα (Etchison et al., 1982, Kempf και Barton, 2008). Επιπλέον, οι ιϊκές πρωτεΐνες 2B και 3A αναστέλλουν την έκκριση πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή (Doedens και Kirkegaard, 1995).

Γενικά, το κύτταρο του ξενιστή έρχεται αντιμέτωπο με μια αναπόφευκτη καταστροφή εξαιτίας της κυτταρολυτικής φύσης των εντεροϊών. Η ιϊκή πρωτεΐνη 2B είναι μια ιϊκή πορίνη η οποία μπορεί να διασπάσει τόσο τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή που προσβάλλει ο ιός όσο και των διπλανών κυττάρων (Madan et al., 2010). Ωστόσο, τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται στο κύτταρο (από τον ιό) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μπορεί να είναι κατά κάποιον τρόπο αντικρουόμενα. Έτσι, οι εντεροϊοί προκαλούν τόσο αντι-αποπτωτικά (3A και 2B πρωτεΐνες) όσο και προ-αποπτωτικά γεγονότα (VP2, 2A και 3C πρωτεΐνες) στο κύτταρο ξενιστή (Whitton et al., 2005). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο CVB3 επάγει την απόπτωση στους πυραμιδικούς νευρώνες στον ιππόκαμπο (Feuer et al., 2003).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι εντεροϊοί προκαλούν την κατάρπτωση του κυττάρου ξενιστή, μια διαδικασία γνωστή ως αυτοφαγία (Huang et al., 2009, Suhy et al., 2000). Βάσει αυτής της λογικής, πιστεύεται πως οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν την μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος ως σκαλωσιά για την αντιγραφή τους (Yoon et al., 2008). Σημειώνεται, πως γενικά η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή κυτταρικής καταστροφής στους νευρώνες (Alirezaei et al., 2010, Simonsen et al., 2008).

1.6.4. ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Αν και οι εντεροϊοί διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς προκειμένου να αποφύγουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, η επιτυχία τους δεν είναι απόλυτη, και ο αγώνας μεταξύ του ξενιστή και του ιού μπορεί να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κάτω από τις επιλεκτικές πιέσεις που παράγονται από μια επιτυχημένη ανοσολογική απάντηση, μερικές φορές η καλύτερη άμυνα του ιού είναι η μετάλλαξη. Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, λάθη κατά την αντιγραφή των εντεροϊών μπορεί να οδηγήσουν στην ύπαρξη των quasispecies (Domingo et al., 2008) τα οποία μπορεί να διευρύνουν τον τροπισμό των εντεροϊών (Vignuzzi et al., 2006), να βοηθήσουν στη διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση και στην εμμένουσα λοίμωξη. Συνεπώς δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να εγκαθιδρύσουν μία εμμένουσα λοίμωξη στο ΚΝΣ και να αποφύγουν την απομάκρυνσή τους από τον ξενιστή. Πολλοί εντεροϊοί όπως π.χ. ο EV-71, ο PV και ο CBV3 διαθέτουν μηχανισμούς προκειμένου να μετριάσουν την εγγενή ανοσολογική αντίδραση.

1.7. ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η ανοσολογική απόκριση διαδραματίζει κύριο ρόλο στην προστασία του ξενιστή από ιικά παθογόνα τόσο με τη ρύθμιση της απελευθέρωσης των χημειοκινών και των κυτταροκινών για τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων όσο και με την άμεση αντιμετώπιση της μόλυνσης μέσω της απόκρισης των ιντερφερονών. Πρόσφατα μάλιστα δημοσιεύτηκε μία έρευνα σχετικά με την επαγωγή των χημοκινών ως απόκριση σε νευρότροπες μολύνσεις (Hosking et al., 2010). Αυτά τα χημειοεκλεκτικά μόρια μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντικά στον αγώνα έναντι των μικροβίων μέσα σε περιοχές, όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα. Μία συγκεκριμένη χημειοκίνη, η CCL12, ενδεχομένως να έχει έναν βασικό ρόλο στη στρατολόγηση μυελοειδών κυττάρων τα οποία υφίστανται διήθηση κατά μήκος του

αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μολύνονται μετά την είσοδό τους στο χοριοειδές πλέγμα (Tabor-Godwin et al., 2010). Οι παράπλευρες απώλειες κατά την ενεργοποίηση των κυτταρολυτικών Τ κυττάρων όταν πραγματοποιείται μια ειδικευμένη ανοσολογική απόκριση μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μπορεί να είναι δυνητικά πιο καταστροφικές στους νευρώνες από την ίδια την ιογενή μόλυνση. Έτσι, ο ξενιστής μπορεί να περιορίσει ή να ελέγξει την ανοσολογική απόκριση σε απάντηση σε μια ιογενή λοίμωξη μέσα σε συγκεκριμένες περιοχές. Ο περιορισμός αυτός μπορεί εν μέρει να εξηγήσει γιατί ορισμένοι ιοί μπορούν να στοχεύουν κατά προτίμηση το κεντρικό νευρικό σύστημα (Rhoades et al., 2011).

1.8. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Υπάρχουν έξι αναγνωρισμένοι τρόποι μετάδοσης των εντεροϊών, όπου ο καθένας επηρεάζει την επιδημιολογική εικόνα που σχετίζεται με την λοίμωξη. Οι έξι τρόποι μετάδοσης είναι μέσω: της κοπράνων-στόματος οδού, του νερού, τη μετάδοση-πρόσληψη μέσω του φαγητού, της αναπνευστικής οδού, της απευθείας εισροής υλικού στο σώμα, της μετάδοσης-πρόσληψης μέσω αίματος (Αναστασία Ρουμελιώτη, Οδηγίες – Φύλλα Κατάρτισης Νοσημάτων, Νοέμβριος 2007). Όπως πολλοί άλλοι ιοί, οι εντεροϊοί μπορεί να μεταδοθούν ταχύτατα μέσα σε διάφορα ιδρύματα, όταν οι συνθήκες – για παράδειγμα ο συνωστισμός, οι κακές συνθήκες υγιεινής ή μολυσμένο νερό – το επιτρέπουν. Σχολικές ομάδες ή ομάδες δραστηριοτήτων και δραστήρια άτομα με νοητική υστέρηση περιορισμένα σε ιδρύματα μπορεί να βρίσκονται σε ιδιαίτερο κίνδυνο (Evans et al., 1997).

Αξιίζει επίσης να αναφερθεί ότι οι εντεροϊοί ξεχωρίζουν από τα άλλα γένη της οικογένειας των *picornaviridae* λόγω των φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως η ελαφρά πυκνότητα επίπλευσης σε χλωριούχο καΐσιο και η σταθερότητα σε ασθενή οξέα. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε pH 3-10. Αυτό το χαρακτηριστικό τους καθιστά ικανούς να επιβιώνουν κατά τη μεταφορά μέσω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου και να φτάνουν στον κατώτερο εντερικό σωλήνα (Modlin et al., 2000). Ο λοιμογόνος εντεροϊός είναι σχετικά ανθεκτικός σε πολλά κοινά εργαστηριακά αντισηπτικά, όπως η 70% αιθανόλη, ισοπροπανόλη και μείγματα αμμωνίου. Οι εντεροϊοί επίσης δεν είναι ευαίσθητοι σε διαλυτικά λίπους και είναι σταθεροί σε πολλά απολυμαντικά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά, οι εντεροϊοί αδρανοποιούνται από τη φορμαλδεΰδη, τη γλουτεράλδεΰδη, τα ισχυρά οξέα, το υποχλωριώδες νάτριο και την ελεύθερη από υπόλειμμα

χλωρίνη. Η αδρανοποίηση τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση, το pH, τα εξωγενή οργανικά υλικά και τον χρόνο επώασης (Abad et al., 1997). Οι εντεροϊοί είναι σχετικά σταθεροί σε θερμοκρασία δωματίου. Σχεδόν οι περισσότεροι εντεροϊοί αδρανοποιούνται στους 42° C, εν τούτοις κάποιοι παράγοντες που ελαττώνουν τις σουλφυδρικές ομάδες και τα κατιόντα μαγνησίου μπορούν να σταθεροποιήσουν τους ιούς ώστε να αντέχουν στους 50°C (Ackermann et al., 1970 και Dorval et al., 1989). Όπως και με άλλους λοιμογόνους παράγοντες, το υπεριώδες φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αδρανοποίηση των εντεροϊών, ειδικά σε επιφάνειες. Εντούτοις, η αδρανοποίηση της μολυσματικότητας μπορεί να μην σχετίζεται άμεσα με την καταστροφή του ιϊκού γονιδιώματος, γιατί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση του ιϊκού RNA ακόμη και μετά από την αδρανοποίηση του ιού (Ma et al., 1994).

Τα κύρια πρότυπα εμφάνισης των εντεροϊών είναι δυο, το ενδημικό και το επιδημικό (Pallansch et al., 2003). Το επιδημικό πρότυπο, όπως αναφέρθηκε για τον ιό Echo 9 στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, χαρακτηρίζεται από γρήγορη αύξηση του αριθμού των απομονώσεων και ακολουθείται από περιόδους με λιγότερες απομονώσεις. Μεγάλες επιδημίες του ιού Echo 9 συνέβαιναν στις ΗΠΑ κάθε 3–4 χρόνια. Επιπλέον, ο ιός Echo 30 εμφανίζει ένα επιδημικό πρότυπο, αλλά με αύξηση του αριθμού των απομονώσεων για μεγαλύτερη χρονική περίοδο. Από την άλλη, ο ιός CVB3 απομονώνεται στους ίδιους περίπου αριθμούς κάθε χρόνο, εκτός από μία απότομη αύξηση το 1980, εμφανίζοντας με αυτό το τρόπο ενδημικό πρότυπο μετάδοσης. Και για άλλους εντεροϊούς παρατηρούνται παρόμοια επιδημικά και ενδημικά πρότυπα, αλλά η βιολογική βάση για την επιδημική ή ενδημική μορφή θεωρείται άγνωστη (Pallansch et al., 2003).

Με την χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας για τη μελέτη της επιδημιολογίας των εντεροϊών, υπάρχουν όλο και περισσότερα δεδομένα. Οι έρευνες αυτές έδειξαν ότι οι πολιοϊοί που κυκλοφορούν σε ένα συγκεκριμένο γεωγραφικό τόπο, τείνουν να σχετίζονται μεταξύ τους γενετικά και παράλληλα, να διαφέρουν από άλλους πολιοϊούς που κυκλοφορούν σε γειτονικές περιοχές. Η επιδημική συμπεριφορά κάποιων εντεροϊών αντικατοπτρίζεται στον ιό Echo 30, όπου τα στελέχη που επικρατούν αντικαθιστούν λιγότερο εδραιωμένα στελέχη (Oberste et al., 1999, Savolainen et al., 2001, Palacios et al., 2002). Οι γενεές (lineages) του Echo 30 δε φαίνονται να είναι γεωγραφικά περιορισμένες, καθώς μία συγκεκριμένη γενεά μπορεί να κυκλοφορεί σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου την ίδια χρονική στιγμή.

Η αιφνίδια παγκόσμια εμφάνιση του Echo 13 το 2001 (Avellon et al., 2003, Mullins et al., 2004) και η μετέπειτα εξαφάνισή του, φανερώνει τη δυνατότητα των εντεροϊών να κυκλοφορούν απρόβλεπτα, και υπογραμμίζει την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση των εντεροϊών. Η παγκόσμια κυκλοφορία των οροτύπων των εντεροϊών που προκαλούν διαδεδομένα κλινικά νοσήματα, έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν, ειδικά με τους Echo 9, 30, EV70, και EV71 (Brown et al., 1999, Melnick et al., 1997, Oberste et al., 1999).

Μόνο στις ΗΠΑ, υπολογίζεται ότι οι εντεροϊοί προκαλούν 5-10 εκατομμύρια συμπτωματικές μολύνσεις κάθε χρόνο (Arola et al., 1996). Οι μη-πόλιο εντεροϊοί ευθύνονται για 30000-50000 παιδιατρικές νοσηλείες για άσηπτη μηνιγγίτιδα κάθε χρόνο στις ΗΠΑ (Baily et al., 1996), με το 80-92% όλων των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας να είναι άγνωστος ο αιτιολογικός παράγοντας (Siafakas et al., 2004). Στην Ελλάδα, η Α' Παιδιατρική Κλινική Αθηνών αναφέρει ότι εμφανίζονται 17/ 100000 περιπτώσεις ιογενούς μηνιγγίτιδας σε παιδιά 1-14 ετών, ανά χρόνο, και 24/100000 παιδιά ετών <5 ετών. Μεγαλύτερο από 80% όλων των ιογενών μηνιγγίτιδων οφείλονται σε εντεροϊούς και κατά συνέπεια ο όρος άσηπτη μηνιγγίτιδα αφορά κυρίως λοιμώξεις από εντεροϊούς (Α. Μεντής, 2008).

1.9. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΕΤΑΙ ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ

1.9.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η μηνιγγίτιδα κατέχει υψηλή θέση μεταξύ των λοιμώξεων κατά την άσκηση της επείγουσας ιατρικής. Η διάγνωση της εξαρτάται από τον υψηλό βαθμό υποψίας του κλινικού γιατρού και από την άμεση λήψη κατάλληλων και επαρκών δειγμάτων προς εξέταση. Ο κίνδυνος του θανάτου ή ανεπανόρθωτης βλάβης είναι μεγάλος αν δεν αρχίσει άμεσα η κατάλληλη θεραπεία. Στη μηνιγγίτιδα σπάνια υπάρχει μια δεύτερη ευκαιρία λήψης, προτού αρχίσει η θεραπεία, δειγμάτων τα οποία κρίνονται απαραίτητα για την αιτιολογική διάγνωση και την όσο το δυνατόν καλύτερη διαχείριση του ασθενούς. Επείγον διαγνωστικό πρόβλημα αποτελεί η διαφορική διάγνωση της οξείας βακτηριακής μηνιγγίτιδας από την άσηπτη. Για τη διάγνωση της μηνιγγίτιδας εξετάζεται το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) ενώ παράλληλα λαμβάνονται και δείγματα αίματος και κοπράνων προς καλλιέργεια για διαπίστωση μικροβιαμίας (Αναστασία Ρουμελιώτη, 2007).

Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν από εγκεφαλονωτιαίο υγρό και κόπρανα. Η ανίχνευση εντεροϊών με την χρήση κοπράνων μπορεί να

γίνει αρκετές μέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και θεωρείται μια ευαίσθητη δοκιμή. Αυτό συμβαίνει γιατί ο ιός μπορεί και αντιγράφεται στο επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα εβδομάδες μετά την μόλυνση με ή χωρίς συμπτώματα. Ωστόσο, ο εντοπισμός του γενετικού υλικού του ιού σε δείγματα κοπράνων δεν επιβεβαιώνει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της μηνιγγίτιδας είναι ο εντεροϊός. Σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με μηνιγγίτιδα οφειλόμενη σε κάποια άλλη διαγνωσμένη αιτία, ανιχνεύτηκε γενετικό υλικό εντεροϊών σε δείγματα κοπράνων (Kurila et al., 2005).

1.9.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΗΠΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Εργαστηριακά ευρήματα από τη γενική εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ), που συνηγορούν υπέρ της άσηπτης (ιογενούς) μηνιγγίτιδας, περιλαμβάνουν μέτρια σχετικά αύξηση των λευκών (συνήθως <2.000 κύτταρα) με λεμφοκυτταρικό τύπο, φυσιολογική γλυκόζη και μέτρια αυξημένο λεύκωμα. Παράλληλα, η χρώση κατά Gram, η αναζήτηση μικροβιακών αντιγόνων και η καλλιέργεια του ΕΝΥ είναι αρνητικές. Όμως στην κλινική πράξη, συχνά, όταν γίνεται οσφυονωτιαία παρακέντηση τα πρώτα 24ωρα της νόσου, ανευρίσκεται ο πολυμορφοκυτταρικός τύπος λευκών στο ΕΝΥ.

Γενικά, υποψία μόλυνσης από ιό αποτελεί η ένδειξη ύπαρξης στο ΕΝΥ αριθμού λευκοκυττάρων (WBC-White Blood Cells) μεγαλύτερου από 1κύτταρο/cm³. Οι αρχές του Harrison προτείνουν ότι, στην ιϊκή μηνιγγίτιδα “το τυπικό προφίλ περιλαμβάνει λεμφοκυτταρική πλειοκύττωση (25–500 cells/μl), φυσιολογική ή ελάχιστα αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης (0,2–0,8g/L [20–80mg/dL]), μία φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης και μια φυσιολογική ή ελαφρώς αυξημένη πίεση (100–300 mm H₂O). Ωστόσο, αυτές οι αρχές δεν ισχύουν πάντοτε στις ιϊκές μηνιγγίτιδες (Ramers et al., 2000, Sawyer et al., 2001, Whitley et al., 2002).

1.9.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Μια ποικιλία από διαφορετικές τεχνικές έχει χρησιμοποιηθεί στην κλινική διάγνωση των μολύνσεων από εντεροϊούς στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η τεχνική GreeneChip από τον Ian Lipkin αποτελεί μια τεχνολογική εξέλιξη για την ταυτοποίηση παθογόνων, αλλά δεν έχει χρησιμοποιηθεί ακόμα για την ανίχνευση μολύνσεων εντεροϊών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Hunter et al., 2008). Η διάγνωση με την χρήση καλλιεργείων χρησιμοποιώντας διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές

περιορίζεται και εμποδίζεται αρχικά από την απουσία κυτταρικών σειρών που να υποστηρίζουν την αντιγραφή όλων των εντεροϊών (Leland and Ginocchio, 2007). Αντίθετα, μοριακές τεχνικές, όπως η RT-PCR, είναι ευαίσθητες και ειδικές μεθοδολογίες για την ταυτοποίηση της μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊούς. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό από προσβεβλημένους ασθενείς είναι η τέλεια πηγή κλινικού δείγματος στο οποίο μπορούν να εφαρμοστούν αυτές οι τεχνικές. Η γενωμική ανάλυση με την χρήση RT-PCR μπορεί να ολοκληρωθεί 24 ώρες μετά την συλλογή του δείγματος (Romero et al., 1999). Η μοριακή ανίχνευση εντεροϊών με RT-PCR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για την αναγνώριση συντηρημένων περιοχών στην 5' UTR (Rotbart et al., 1990). Παρόλο που η ταυτοποίηση σε επίπεδο του γένους των εντεροϊών μπορεί να είναι κλινικά σημαντική και να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για την χρήση των σωστών αντιικών φαρμάκων, η όρο-ειδική γονοτύπηση απαιτείται σε μερικές περιπτώσεις. Ο χαρακτηρισμός με RT-PCR της VP1 γενωμικής περιοχής έχει οδηγήσει σε φυλογενετική κατηγοριοποίηση των εντεροϊών (Mirand et al., 2008). Η σύγκριση των αλληλουχιών στην περιοχή VP1 δίνει γενικά πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για την ταυτοποίηση του ορότυπου από αυτές των περιοχών VP2/VP4 (Oberste et al., 1999a, Mulders et al., 2000, Savolainen et al., 2002, Kottaridi et al., 2004). Για την ανίχνευση του ορότυπου γίνεται ενίσχυση της περιοχής VP1 (2602–2951nt) με την χρήση των εκκινητών AN89/AN88. Το γόνιδο VP1 χρησιμοποιείται γιατί η αλληλούχηση του 5'UTR δεν είναι αρκετή για την ταυτοποίηση του ορότυπου του εντεροϊού σε κλινικά δείγματα (Iizuka et al, 1987, Inoue et al, 1989, Jenkins et al, 1987, Kapsenberg, J. et al., 1988, Siafakas et al., 2004).

Η ποσοτική Real-Time PCR (qRT-PCR) αποτελεί μια ευαίσθητη μοριακή τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση του ιικού φορτίου σε κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Dierssen et al., 2008).

Τεχνική	Μέθοδος Ταυτοποίησης	Δείγμα	Εργαλεία	Ειδικότητα
Κυτταροκαλλιέργεια	Παρουσία κυτταροπαθογόνου δράσης στα κύτταρα	ENY	Ειδικές κυτταρικές σειρές	Γένος
RT-PCR και αλληλούχηση γενώματος	Ενίσχυση γενώματος	ENY	Εκκινητές ειδικοί για εντεροϊούς – κυρίως ενίσχυση της VP1	Ορότυπος – νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις
QPCR	Ενίσχυση γενώματος	ENY	Εκκινητές ειδικοί για εντεροϊούς – κυρίως ενίσχυση του 5' UTR	Γένος
Ανοσοϊστοχημεία	Οπτικοποίηση με την χρήση ειδικών ιικών αντισωμάτων	Ιστός ΚΝΣ	Οπτικοποίηση/μικροσκόπιο	Κυτταρικός εντοπισμός

In situ υβριδισμός	Οπτικοποίηση με την χρήση ειδικών ειδικών αντισωμάτων	Ιστός ΚΝΣ	Οπτικοποίηση/μικροσκόπιο	Κυτταρικός εντοπισμός
--------------------	---	-----------	--------------------------	-----------------------

Πίνακας 4: Παρουσίαση τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των εντεροϊών (Roades et al., 2011).

1.10. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Η ανάπτυξη εμβολίων κατά της πολιομυελίτιδας κατέστη δυνατή καθώς υπάρχουν μόνο τρεις τύποι πολιο-ϊών . Το 1954, ο Dr Jonas Salk και το 1960 Dr Albert Sabin και οι συνεργάτες τους ανέπτυξαν το νεκρό ενδομυϊκό εμβόλιο (IPV) και το από του στόματος εξασθενημένο εμβόλιο (OPV), αντίστοιχα. Και τα δύο εμβόλια οδηγούν στην παραγωγή αντισωμάτων κατά του ιού της πολιομυελίτιδας, με επακόλουθο την προστασία από τη νόσο (Más Lago P et al, 2001). Μετά την εισαγωγή των εμβολίων στο τέλος της δεκαετίας του '50 και αρχές του '60, το μεγαλύτερο μέρος του αναπτυσσόμενου κόσμου είναι τώρα ελεύθερο από την πολιομυελίτιδα. Σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, το επιχορηγούμενο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, έχει κάνει πολύ μεγάλη πρόοδο (Muir et al., 1998). Μέχρι τώρα, κανένα εμβόλιο για τους μη πολιο-εντεροϊούς δεν έχει αναπτυχθεί με επιτυχία, λόγω του μεγάλου αριθμού διαφορετικών τύπων εντεροϊών. Το μόνο αποτελεσματικό μέτρο για τον έλεγχό τους είναι οι υψηλές συνθήκες ατομικής και ομαδικής υγιεινής. Η απομόνωση των ασθενών σε περιόδους εξάρσεων των λοιμώξεων δεν είναι αποτελεσματική, γιατί υπάρχουν σε μεγάλη συχνότητα υποκλινικές λοιμώξεις (Minor et al., 1998).

Μέχρι τώρα, κανένα φάρμακο έναντι των picorna ιών δεν έχει πάρει έγκριση για θεραπεία των λοιμώξεων από εντεροϊούς. Η ευαισθησία των κυττάρων, η προσκόλληση του ιού, η απελευθέρωση του ιού, ο αναδιπλασιασμός του RNA του ιού και η πρωτεϊνοσύνθεση του ιού, έχουν μελετηθεί ως πιθανοί στόχοι έναντι των ιών picorna (Rotbart et al., 2002).

Σκοπός πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της πτυχιακής αυτής εργασίας ήταν η εξέταση 158 δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) ασθενών με άσηπτη μηνιγγίτιδα προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία εντεροϊών, εν συνεχεία η ταυτοποίησή τους και τέλος η επιδημιολογική συσχέτισή τους με στελέχη που κυκλοφόρησαν παγκοσμίως.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στην παρούσα εργασία ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος πολιοιού Sabin2. Το στέλεχος αυτό προέρχεται από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom) και έχει αριθμό καταχώρησης στο GenBank X00595. Το Sabin2 χρησιμοποιήθηκε επίσης ως μάρτυρας ελέγχου ευαισθησίας των πειραματικών μεθόδων.

3.1.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας εξετάστηκαν 158 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) για την παρουσία εντεροϊών, τα οποία προέρχονταν από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας. Στους πίνακες 5Α–5Δ αναγράφονται πληροφορίες των κλινικών δειγμάτων, όπως ο αριθμός κυττάρων(κύτταρα/μl), η ημερομηνία λήψης του δείγματος, η περιοχή απομόνωσης, το φύλο, η κλινική εικόνα και ο κωδικός του δείγματος. Τα δείγματα αυτά παρουσιάζονται υποκατηγοριοποιημένα με βάση τον αριθμό των κυττάρων, 0–100 κύτταρα/μl (Πίνακας 5Α), 100–300 κύτταρα/μl (Πίνακας 5Β), 300–2800 κύτταρα/μl (Πίνακας 5Γ) και άγνωστος αριθμός κυττάρων (Πίνακας 5Δ). Τα δείγματα προέρχονται από ασθενείς με συμπτώματα μηνιγγίτιδας ηλικίας από 1 μηνός έως 78 ετών. Σημειώνεται πως για ορισμένα δείγματα δεν υπήρχαν όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες. Επιπλέον, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία βρέθηκαν όλα αρνητικά για βακτηριακή μηνιγγίτιδα με τις παρακάτω διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας:

- Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* και *Haemophilus influenzae* type b.
- Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *H. influenzae* (non b), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus*

σpp σε βιολογικά υλικά όπως ΕΝΥ, αίμα, ωτικά υγρά, πλευριτικά υγρά κλπ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5Α (1–100 κύτταρα/μl)							
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΡΓ. ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΗΛΙΚΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ENY2	W-1595	70	14/2/2007	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	61 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY4	W-1744	45	21/6/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	6 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY5	W-1746	32	21/6/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	3 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY7	W-1752	2	25/6/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	3 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY8	W-1761	18	27/6/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	5 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY15	W-1893	8	15/10/2007	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	27 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY24	W-2551	98	21/4/2009	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	7 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY25	W-2553	5	17/4/2009	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	8 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY27	W-2658	90	21/6/2009	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΘΥΛΗ	2 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY31	W-2763	70	4/9/2009	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΘΥΛΗ	9 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY32	W-2784	82	2/10/2009	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΘΥΛΗ	85 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY33	W-2808	55	22/10/2009	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	8 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY35	AK-1388	93	3/3/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	4 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY37	BM-1043	92	1/5/2010	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	4 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY39	W-2947	96	1/2/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY40	W-2958	38	10/2/2010	ΧΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	24 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY42	W-2966	50	16/2/2010	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	3 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY46	W-3063	70	25/4/2010	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY51	W-3082	22	12/5/2010	ΑΧΑΙΑ	ΘΥΛΗ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY62	W-3137	100	22/6/2010	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	67 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY64	W-3163	83	20/7/2010	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΑΡΡΕΝ	6 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY72	W-3206	75	26/8/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	75 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY73	W-3212	61	28/8/2010	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΘΥΛΗ	13 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY76	W-3243	100	30/9/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY80	W-3274	75	26/10/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	6 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY86	W-3305	69	17/11/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	75 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY87	W-3311	60	17/11/2010	ΛΑΡΙΣΑ	ΑΡΡΕΝ	5 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY91	W-3329	90	3/12/2010	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	7 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY92	W-3336	60	7/12/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	8 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY96	W-3346	67	19/12/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΑΡΡΕΝ	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY137	W-3374	100	17/1/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	61 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY138	W-3461	100	30/3/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	21 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY139	W-3678	100	16/9/2011	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	62 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY140	W-3406	93	8/2/2011	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	42 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY141	W-3605	90	25/7/2011	ΑΡΤΑ	ΘΥΛΗ	5 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY142	W-3363	89	9/1/2011	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	9 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY143	W-3389	80	30/1/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	7 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY144	W-3560	75	15/6/2011	ΛΑΡΙΣΑ	ΘΥΛΗ	6 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY145	BM-1082	75	26/6/2011	ΑΘΗΝΑ	ΑΡΡΕΝ	5 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ENY146	AK-1488	73	4/5/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY147	W-3540	67	30/5/2011	ΑΡΤΑ	APPEN	5 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY148	W-3543	51	1/6/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	8 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY149	BM-1085		12/9/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	11 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 5B (100–300 κύτταρα/μl)							
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΡΓ. ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΗΛΙΚΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ENY1	AK-1176	240	29/6/2007	ΑΘΗΝΑ	APPEN	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY6	W-1751	300	25/6/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY9	W-1781	230	5/7/2007	ΑΘΗΝΑ	APPEN	10 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY10	W-1823	134	13/8/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	28 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY11	W-1851	280	25/9/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	18 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY13	W-1881	262	6/10/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	40 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY14	W-1891	180	15/10/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	30 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY34	AK-1381	172	19/2/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY38	W-2909	182	1/1/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	12 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY41	W-2965	180	16/2/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	40 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY43	W-3017	220	15/3/2010	ΛΑΜΙΑ	APPEN		ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY44	W-3052	145	19/4/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY47	AK-1408	113	21/5/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY48	AK-1412	170	4/7/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	5 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY49	AK-1413	105	6/7/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY52	W-3083	210	12/5/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	36 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY56	W-3112	250	3/6/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	3 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY58	W-3119	300	10/6/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY59	W-3124	255	12/6/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	11 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY61	W-3134	140	21/6/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΘΥΛΗ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY65	W-3173	161	28/7/2010	ΑΧΑΙΑ	APPEN	11 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY67	AK-1419	122	13/8/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY68	AK-1437	125	1/11/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	1 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY69	BM-1057	125	13/10/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY70	BM-1059	205	27/10/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	8 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY82	AK-1439	115	17/11/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY84	AK-1440	192	16/11/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	11 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY85	BM-1068	295	30/12/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	1 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY89	W-3318	180	23/11/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	2 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY90	W-3327	150	30/11/2010	ΛΑΜΙΑ	ΘΥΛΗ	18 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY115	W-3544	300	2/6/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	36 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY116	W-3645 a	300	22/8/2011	ΛΑΡΙΣΑ	APPEN	10 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY117	W-3611	290	28/7/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	29 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY118	W-3553	270	10/6/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	3 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY119	BM-1080	270	15/6/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY120	W-3484	240	17/4/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY121	W-3668	215	9/9/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	33 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY122	W-3395	210	31/1/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	35 ΗΜ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ENY123	W-3487	200	19/4/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	19 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY124	W-3562	200	20/6/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	53 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY125	W-3642	200	21/8/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	77 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY126	W-3438	192	11/3/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	28 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY127	W-3399	180	2/2/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY128	W-3501	180	27/4/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	5 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY129	W-3559	175	15/6/2011	ΛΑΡΙΣΑ	APPEN	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY130	W-3581	175	5/7/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY131	W-3457	162	24/3/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	12 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY132	W-3387	150	27/1/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	16 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY133	W-3428	120	27/2/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	14 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY134	BM-1069	116	7/1/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY135	W-3624	116	9/8/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	10 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY136	W-3366	115	12/1/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	52 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 5Γ (300–2800 κύτταρα/μl)							
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΡΓ. ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΗΛΙΚΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ENY3	W-1616	550	8/3/2007	ΑΘΗΝΑ	APPEN	20 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY12	W-1859	550	27/9/2007	ΑΘΗΝΑ	APPEN	37 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY16	W-1901	850	23/10/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY23	W-2457	700	20/2/2009	ΑΘΗΝΑ	APPEN	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY26	W-2620	1100	31/5/2009	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	27 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY28	W-2661	1200	22/6/2009	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΘΥΛΗ	7 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY29	W-2686	1110	7/7/2009	ΑΘΗΝΑ	APPEN	5 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY30	BM-1025	810	27/10/2009	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	6 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY36	BM-1041	580	26/4/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	12 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY45	W-3060	2800	22/4/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	61 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY50	AK-1416	2000	28/7/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	14 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY53	W-3095	470	11/5/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	10 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY54	W-3107	750	28/5/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN		ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY55	W-3111	800	2/6/2010	ΣΕΡΡΕΣ	ΘΥΛΗ	46 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY57	W-3117	310	2/6/2010	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	APPEN	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY60	W-3125	700	11/6/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	4 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY63	W-3143	385	30/6/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	2 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY66	W-3175	375	28/7/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	20 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY71	W-3193	362	5/8/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	23 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY74	W-3214	1100	1/9/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	28 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY75	W-3241(1/2)	800	30/9/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	23 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY77	W-3251	1270	9/10/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	5 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY78	W-3262	452	16/10/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	39 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY79	W-3263	400	20/10/2010	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	3 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY81	W-3292	400	11/11/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	19 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY94	W-3342	822	10/12/2010	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	4 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY97	W-3579	1500	23/6/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	23 X	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY98	W-3615	1230	30/7/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN		ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ENY99	W-3669	800	10/9/2011	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	APPEN	15 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY100	W-3369	630	13/1/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	ΘΥΛΗ	2 μην	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY101	W-3370	660	13/1/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	2 μην	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY102	W-3435	785	8/3/2011	ΑΡΤΑ	APPEN	1 μην	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY103	W-3440	700	14/3/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	33 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY104	W-3627	710	5/8/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	3 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY105	W-3618	580	3/8/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	70 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY106	W-3377	560	17/1/2011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	APPEN	1 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY107	W-3619	550	3/8/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	65 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY108	W-3647	550	22/8/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	72 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY109	W-3633	535	16/8/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	78 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY110	W-3498	480	29/4/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	8 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY111	AK-1479	475	9/4/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY112	AK-1493	443	17/6/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	12 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY113	BM-1077	400	1/5/2011	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	5 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY114	BM-1079	350	18/5/2011	ΑΘΗΝΑ	APPEN	12 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 5Δ							
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΡΓ. ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΨΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΗΛΙΚΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
ENY17	AK-1181	-	2/8/2007	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY18	AK-1273	-	2008				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY19	BM-977	-	2008				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY20	BM-979	-	2008				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY21	W-2350	-	2008				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY22	W-2403	-	4/1/2009	ΑΘΗΝΑ	ΘΥΛΗ	2 ΜΗΝ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY83	AK-1439a	-					ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY88	W-3311a	-					ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY93	W-3339	-	10/12/2010	ΑΘΗΝΑ	APPEN	8 Χ	ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY95	W-3342a	-					ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY150	W-3683	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY151	W-3693	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY152	W-3694	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY153	W-3695	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY154	W-3754	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY155	AK-1510	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY156	AK-1512	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY157	BM-1086	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ
ENY158	Θ-337	-	2011				ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

Πίνακας 5: Πληροφορίες των 158 κλινικών δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτίδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (Χ: χρονών, ΜΗΝ: μηνών). (Α) Δείγματα με αριθμό κυττάρων 0-100 κύτταρα/μλ, (Β) 100-300 κύτταρα/μλ, (Γ) 300-2800 κύτταρα/μλ και (Δ) άγνωστος αριθμός κυττάρων.

3.1.3. ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Αγαρόζη (Invitrogen), Κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), Χλωριούχο ασβέστιο (Merk, Germany), EDTA (Sigma, USA), Βρωμιούχο Αιθίδιο, Χλωριούχο νάτριο (Sigma, USA), Trizma base (Merk, Germany), Τρυπτόνη (Sigma, USA), Yeast extract (Sigma, USA), σουκρόζη (Sigma, USA).

3.1.4. ANTIBIOTIKA

Η αμπικιλίνη (Sigma, USA) χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 100 µg/ml στο LB Agar και στο LB Broth.

3.1.5. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

LB Broth (Sigma, USA), LB agar Broth (Sigma, USA)

3.1.6. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (Πίνακες 6–9)

Πίνακας 6: Ρυθμιστικά διαλύματα για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης		
Διάλυμα	Working Solution	Stock Solution/Liter
TBE (1L)	1x	10x
	10.8gr Tris base	108gr Tris base
	5.5gr Boric acid	55gr Boric acid
	4ml EDTA 0.5M pH8	40ml EDTA 0.5M pH8

Πίνακας 7: Διάλυμα φόρτωσης DNA σε πηκτή αγαρόζης	
1 mM EDTA	Θερμοκρασία διατήρησης
0.25% Κυανό της βρωμοφαινόλης	Θερμοκρασία δωματίου
40% σουκρώζη	

Πίνακας 8: Διάλυμα 0,1M CaCl ₂ (50ml)	
0,55g CaCl ₂	ddH ₂ O μέχρι τελικού όγκου 50ml

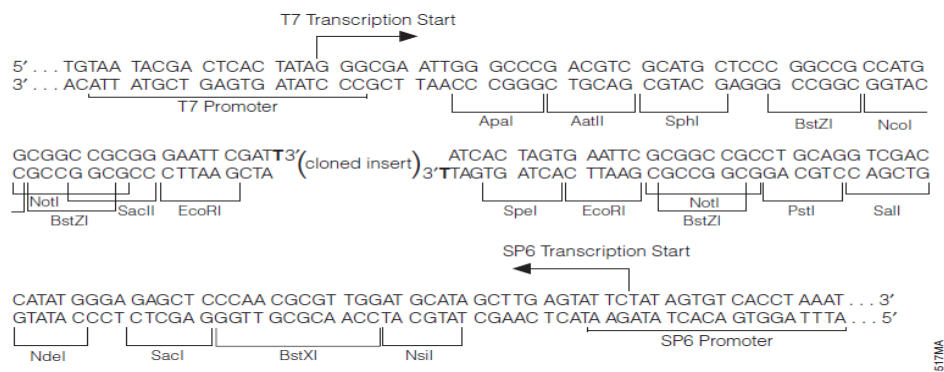
Πίνακας 9: Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
10mg/ml σε H ₂ O, διατήρηση στους 4°C, μεταλλαξιογόνο

3.1.7. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

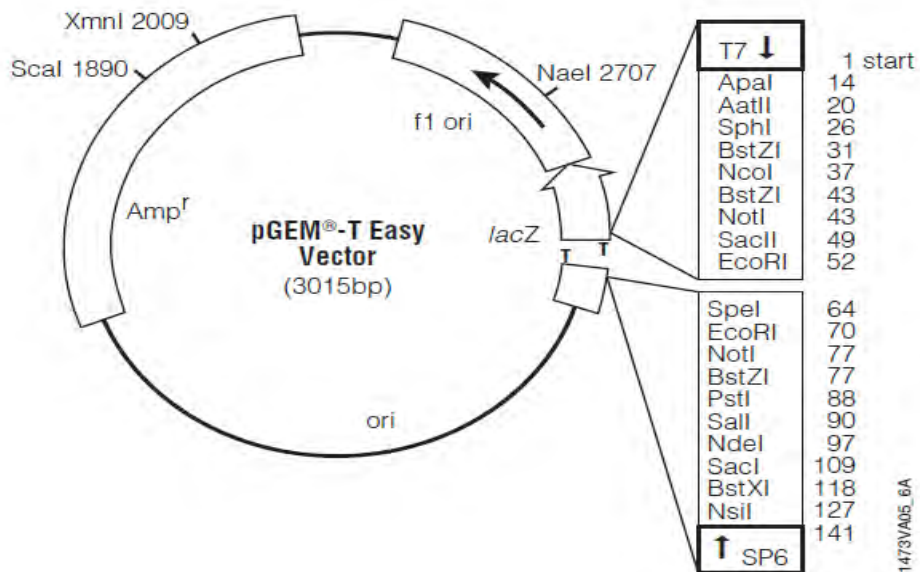
pGEM®-T Easy Vector (Promega)

Χαρακτηριστικά του πλασμιδιακού φορέα pGEM®-T Easy:

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM®-T Easy Vector μπορεί να γραμμοποιηθεί και να προκύψουν σε κάθε άκρο του μια μονή 3' θυμιδίνη (T-overhangs). Η ιδιότητα αυτή βελτιώνει αρκετά την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύνδεσης μορίων προϊόντων PCR, με το να προλαμβάνει την επανακυκλοποίηση του φορέα και παρέχει συμπληρωματικά άκρα για προϊόντα PCR που δημιουργούνται από συγκεκριμένες θερμοσταθερές πολυμεράσες. Επιπλέον, ο φορέας αυτός αντιγράφεται πολλές φορές μέσα στο κύτταρο (high-copy-number vector) και περιέχει υποκινητές για τις T7 και SP6 RNA πολυμεράσες δίπλα στην πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (multiple cloning region), μέσα στη κωδική περιοχή του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Η απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω εισόδου του επιθυμητού τμήματος DNA επιτρέπει την ταυτοποίηση των ανασυνδιασμένων βακτηρίων με βάση το χρώμα της αποικίας (λευκό ή μπλε). Επίσης, η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης περιέχει πολλές θέσεις για ένζυμα περιορισμού, όπως EcoRI, BstZI και NotI, παρέχοντας έτσι τρεις τρόπους απελευθέρωσης του ενθέματος (Εικόνα 17). Τέλος, ο φορέας αυτός παρέχεται με 2X Rapid Ligation Buffer. Η αντίδραση σύνδεσης μορίων με την χρήση αυτού του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να γίνει σε μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (ή όλη την νύχτα στους 4°C για να παρθεί ο μέγιστος αριθμός των ανασυνδιασμένων φορέων).



Εικόνα 17: Αλληλουχίες του υποκινητή και της θέσης πολλαπλής κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα pGEM®-T Easy Vector.



Εικόνα 18: Χάρτης του pGEM®-T Easy Vector πλασμιδιακού φορέα.

3.1.8. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

E.COLI DH-5 aF'

Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για την παραγωγή πλασμιδιακών φορέων σε μεγάλες ποσότητες. Αποτελεί ένα από τα πλέον κατάλληλα στελέχη για τη χρήση σε τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, κυρίως λόγω των παρακάτω μεταλλάξεων:

endA1: Το προϊόν του γονιδίου endA είναι η ενδονουκλεάση 1, η οποία εξαρτάται από το μαγνήσιο και δημιουργεί εγκοπές παρουσία RNA ή δρα σαν νουκλεάση και καταστρέφει δίκλωνο DNA, απουσία RNA. Συνεπώς το συγκεκριμένο στέλεχος που φέρει την endA μετάλλαξη παράγει υψηλής ποιότητας πλασμιδιακό DNA.

recA1: Η πρωτεΐνη recA συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Η μετάλλαξη recA1 είναι επιθυμητή για την αποφυγή του ομόλογου ανασυνδυασμού που θα μπορούσε να αποσταθεροποιήσει τον πλασμιδιακό φορέα που εισάγεται στο βακτήριο.

deoR: Η μετάλλαξη deoR επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει ελάχιστα θρεπτικά υλικά όπως μόνο μια πηγή άνθρακα. Επίσης, η μετάλλαξη αυτή επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλων τμημάτων DNA.

gyrA96: Η μετάλλαξη gyrA είναι απαραίτητη σε στελέχη που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση γιατί το προϊόν του γονιδίου gyrA

είναι μια DNA γυράση που μπορεί να προκαλέσει ελλείψεις σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Αλληλουχίες τέτοιου είδους συναντώνται συχνά σε ανασυνδυασμένα τμήματα πλασμιδίων.

lacZΔM15:Η μετάλλαξη lacZΔM15 απενεργοποιεί την ενεργότητα lacZ στα βακτήρια παράγοντας μια ανενεργή μορφή της β-γαλακτοσιδάσης. Τα στελέχη με αυτήν τη μετάλλαξη δεν μπορούν να μεταβολίσουν το X-gal και παραμένουν άχρωμα σε υλικό με X-gal (το X-gal παράγει έντονο μπλε χρώμα όταν κόβεται). Ωστόσο εάν ένα πλασμίδιο που φέρει την α-υπομονάδα του lacZ εισαχθεί στο κύτταρο, τότε λόγω συμπληρωματικότητας παράγεται ενεργή β-γαλακτοσιδάση. Συνήθως, η α-υπομονάδα του lacZ τοποθετείται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με τον πολυσυνδέτη στους pUC πλασμιδιακούς φορείς. Έτσι εισάγοντας ένα τμήμα στον πολυσυνδέτη, διακόπτεται η α-υπομονάδα και οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσιάζονται με λευκό αντί για μπλε χρώμα.

3.1.9. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Το ζεύγος των εκκινητών UG52/UC53 υβριδοποιείται στην 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR) του γενώματος των εντεροϊών και δίνει προϊόν ενίσχυσης 433-450 βάσεων (Georgoroulou et al. 2000). Για την VP1 περιοχή, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88, το οποίο ενισχύει ένα τμήμα 376 βάσεων (Nix et al., 2006).

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Θέση
UG52	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	166-188
UC53	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	588-606
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	Sense	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Antisense	2977-2951

Πίνακας 10: Ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΙΪΚΟΥ RNA

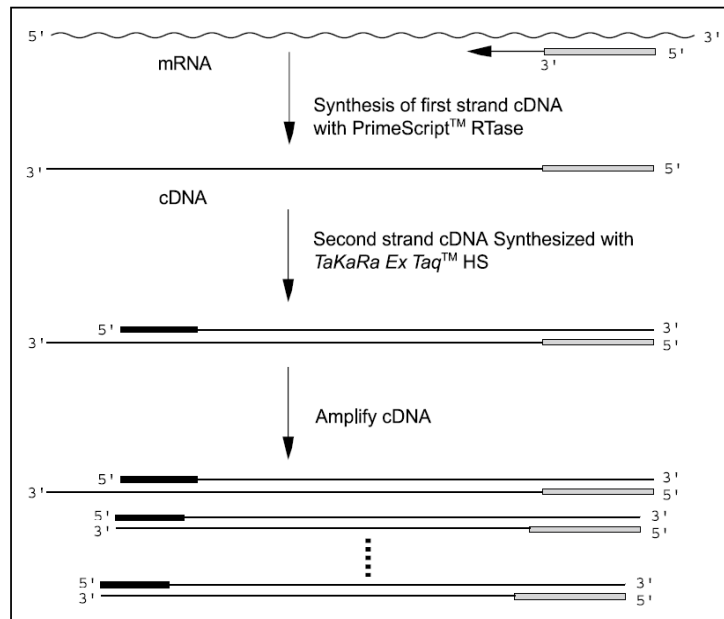
Η εκχύλιση του RNA γενετικού υλικού έγινε με το MagCore Viral Nucleic Acid Extraction Kit της RBC Bioscience σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το Kit αυτό αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο εκχύλισης γενετικού υλικού (DNA/RNA), η οποία βασίζεται στην χρήση

μαγνητικών σφαιριδίων. Η εκχύλιση του ιϊκού RNA πραγματοποιήθηκε από 200μl ENY για κάθε δείγμα του πίνακα 5 και επαναδιαλύθηκε σε τελικό όγκο 200μl διπλά απιονισμένου νερού απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (ddH₂O).

3.2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ – ONE-STEP RT-PCR

Κάθε δείγμα (Πίνακας 5) ελέγχθηκε για την παρουσία εντεροϊών στοχεύοντας την 5' UTR γενωμική περιοχή χρησιμοποιώντας τα εκκινητικά μόρια UG52 και UC53. Στην onestep RT-PCR πραγματοποιείται στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Εικόνα 19). Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript One-Step RT-PCR Kit της εταιρίας TaKaRa (TaKaRa Biomedical group, Shiga, Japan).

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει 0,25μl από κάθε εκκινητή (UG52 και UC53 αρχικής συγκέντρωσης 10 pmol/μl), 12,50 μl One Step Buffer 2X, 0,8μl Prime Script One Step Enzyme Mix και 6,2μl διπλά απιονισμένο νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (ddH₂O) σε τελικό όγκο 20μl. Τέλος προσθέτουμε 5μl από το RNA που προέκυψε από την εκχύλιση. Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 5 μl H₂O ελεύθερου από DNases και RNases. Ακολουθεί τοποθέτηση στη συσκευή PCR (Piko Thermal Cycler, Thermo Scientific) και χρήση του προγράμματος με τις ακόλουθες συνθήκες για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και την ενίσχυση. Η αντίδραση ξεκινά στους 50°C για 30min για την δημιουργία του cDNA και ακολουθεί η PCR με αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec, υβριδοποίηση στους 60°C για 15 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 15 sec. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε 45 κύκλους.



Εικόνα 19: Τα βήματα που ακολουθούνται από την PrimeScript One-Step RT-PCR Kit της εταιρίας TaKaRa. Στην onestep RT-PCR πραγματοποιείται, στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

3.2.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Για την ενίσχυση της VP1 γενωμικής περιοχής των εντεροϊών χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια AN88-AN89. Αρχικά το εκχυλισμένο RNA μετατράπηκε σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Επωάζουμε μίγμα απομονωμένου RNA (5μl), 1 μl 100 pmol/ μl τυχαίων εκκινητών (random primers) d(N9) (TaKara Biomedical group, Shiga, Japan) και 1μl dNTPs 40mM στους 70°C, για 5 min. Πραγματοποιείται άμεσα διακοπή της αντίδρασης με μεταφορά του μίγματος σε πάγο. Στην συνέχεια προστίθεται μείγμα αποτελούμενο από: 4μl 5x M-MLV reaction buffer, 2 μl DTT 0,1M, 20 units αναστολέα ριβονουκλεασών, 100units αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) και διπλά απιονισμένο νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (ddH₂O) μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 5min, και έπειτα στους 37°C για 1 ώρα για τη σύνθεση του cDNA. Τέλος, επωάζουμε στους 95°C για 5 min για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Η PCR για την ενίσχυση της VP1 περιοχής που ακολούθησε την αντίστροφη μεταγραφή έχει ως εξής: Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα που αποτελείται από 5μl dNTPs 10mM, 0,25μl MgCl₂ 100mM, 5μl PCR Buffer 10x, 2μl μίγμα εκκινητών 50pmol/μl, 75μl διπλά απιονισμένο νερό

(ddH₂O) απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες, 3μl cDNA και 0,5μl 5unit/μl Maximo Taq DNA πολυμεράση (GeneOn, Germany) με τελικό όγκο 50μl. Ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν 3 μl H₂O ελεύθερου από DNases και RNases. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε προσθέτει νουκλεοτίδια αδενίνης στα 3' μονόκλωνα άκρα, κάτι το οποίο χρησιμοποιείται στο μετέπειτα στάδιο της κλωνοποίησης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αυτή για το ζεύγος των εκκινητών AN89 και AN88 είναι: 95°C για 5 min, 94°C για 30 sec, 60°C για 15 sec και 72°C για 20 sec για 50 κύκλους, και επώαση στους 72°C για 5 min.

3.2.4. AUTONESTED PCR

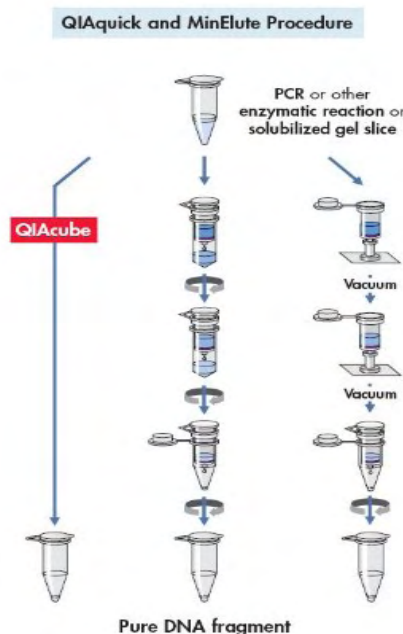
Για την περαιτέρω ενίσχυση των προϊόντων της PCR πριν την κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε autonested PCR όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Πιο συγκεκριμένα το προϊόν της PCR για την ενίσχυση της VP1 γενωμικής περιοχής αραιώθηκε 1/100 και υποβλήθηκε σε μια δεύτερη PCR με τα ίδια εκκινητικά μόρια και με ίδιες συνθήκες για 20 κύκλους.

3.2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν κάθε PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Invitrogen UK). Η περιοχή αυτή κλωνοποιήθηκε σε ένα πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης και αλληλουχήθηκε. Η ανίχνευση των εντεροϊών στα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας στην Αθήνα, ενώ η ενίσχυση, η κλωνοποίηση και αλληλούχηση της VP1 περιοχής στο Εργαστήριο Ιολογίας-Μικροβιολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.2.6. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση, άλατα που μπορεί να έχουν παραμείνει στο διάλυμα μαζί με τα PCR προϊόντα και ίσως να προκαλέσουν προβλήματα στην διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης όπως και στην ανάγνωση κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης. Από το προϊόν της PCR που πραγματοποιήθηκε στην VP1 περιοχή του ιϊκού γενώματος, 40 μ l ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 μ g/ml. Οι αντίστοιχες ζώνες των προϊόντων της PCR κόβονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf των 2ml. Ακολουθεί καθαρισμός των PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης, με το QIAquickGelExtractionKit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, με τη χρήση του συγκεκριμένου kit επιτυγχάνεται η διάλυση της αγαρόζης και η δέσμευση του επιθυμητού PCR προϊόντος σε ειδική στήλη, από την οποία λαμβάνεται μέσω έκλουσης μετά την προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό προϊόντων PCR με την χρήση του QIAquickGelExtractionKit (Qiagen).

3.2.7. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ (LIGATION)

Για την αντίδραση της λιγάσης χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM® – T Easy Vector System (Promega, USA). Κατά την αντίδραση αυτή, οι poly (A) ουρές στα 3' και 5' άκρα των αλληλουχιών

συνδέονται με τα αντίστοιχα poly (T) άκρα του φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA Ligase. Το μείγμα της αντίδρασης της λιγάσης έχει τελικό όγκο 10 μl και περιέχει: 1 μl πλασμιδιακού φορέα pGEM® – T Easy Vector 50 ng, 3 μl του προϊόντος της AutoNested PCR, 1 μl ενζύμου T4 DNA Ligase (3 units/μl) και 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος Rapid Ligation Buffer 2x. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C για 16 ώρες.

3.2.8. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α. Αρχικά, απόθεμα βακτηριακών κυττάρων σε γλυκερόλη στους -80°C συλλέχθηκε και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (Sigma, USA) και ακολούθησε επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210rpm. Στη συνέχεια, 1 ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50 ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210rpm. Η κυτταρική ανάπτυξη διακόπηκε όταν τα κύτταρα βρέθηκαν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους έφτασε στα 0,450–0,550A στα 600 OD. Η διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στον πάγο για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M.

3.2.9. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200 μl από τα δεκτικά κύτταρα σε πλαστικούς σωλήνες των 500 μl. Ακολούθησε προσθήκη 5μl του προϊόντος της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στον αντίστοιχο πλαστικό σωλήνα και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Έπειτα, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και ακολούθως μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2 λεπτά (heatshock). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα των 15 ml

(falcon) με 800 μl LB Broth και επωάστηκαν στους 37°C στις 180 rpm για 1 ώρα (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων, «επούλωση»).















Στη συνέχεια, 300 μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιείχε LB Agar (Sigma) και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml και προστέθηκαν 12 μl X-gal (50 mg/ml, Promega, USA). Ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβάινει στη σύνθεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, αποκλείεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας πέραν όσων έχουν μετασχηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-β-D-γαλακτοσίδιο (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης παράγεται, σχηματίζεται το ενεργό ένζυμο και το X-gal διασπάται παράγοντας αποικίες μπλε χρώματος. Όταν όμως έχει γίνει ένθεση του PCR προϊόντος στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι άχρωμες (λευκές).

Σύμφωνα με την παραπάνω αρχή, έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα δύο από κάθε τριβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη (100μg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

3.2.10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ DNA (NYCLEOSPIN PLASMID DNA PURIFICATION, MACHEREY-NAGEL)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA έγινε με το kit NucleoSpin® Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 21), έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας.

	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	
1 Cultivate and harvest bacterial cells			11,000 x g 30 s
2 Cell lysis			250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, 5 min 300 µL Buffer A3
3 Clarification of the lysate			11,000 x g 5 – 10 min
4 Bind DNA			Load supernatant 11,000 x g 1 min
5 Wash silica membrane			(Optional: 500 µL Buffer AW) 600 µL Buffer A4 11,000 x g 1 min
6 Dry silica membrane			11,000 x g 2 min
7 Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min

Εικόνα 21: Διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA με την χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit της Macherey–Nagel NucleoSpin® Plasmid DNA Purification.

3.2.11. ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης *pGEM-T Easy Vector*, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, η αλληλουχία που αποκόπτεται από τον φορέα με το ένζυμο αφορά μόνο το ένθεμα. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2µl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2µl 10x Buffer, 1 µl EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15µl ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20µl. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρασ της επώασης προστέθηκαν 3 µl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Κατόπιν, η ποσότητα αυτή ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με τη διαδικασία που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα για να πραγματοποιηθεί οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.2.12. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχηση με την χρήση των εκκινητών T7 και SP6 οι οποίοι υβριδίζονται πάνω στο πλασμίδιο εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης. Η αλληλούχηση των κλωνοποιημένων PCR δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία CEMIA (CEMIA, Larissa, Greece).

3.2.13. ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στη GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η αναζήτηση πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στη διεθνή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη χρήση του προγράμματος BLAST (BasicLocalAlignmentSearchTool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης καταγράφονται με μορφή πίνακα. Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζονται τελικά οι κοντινότερες αλληλουχίες με αυτές του δείγματός μας, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης, κι επομένως ομολογίας. Η επεξεργασία των αλληλουχιών, η εύρεση μεταλλάξεων και η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για την γενωμική και φυλογενετική ανάλυση που ακολούθησε πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια των προγραμμάτων Chromas, GeneRunner, Mega 5,1 και Clustal W.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Στην εργασία αυτή εξετάστηκαν 158 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) για την παρουσία εντεροϊών. Από τα 158 κλινικά δείγματα ENY που εξετάστηκαν για την παρουσία εντεροϊών βρέθηκαν θετικά τα 22 στην 5' UTR γενωμική περιοχή χρησιμοποιώντας τα εκκινητικά μόρια UG52 και UC53 (Πίνακας 11).

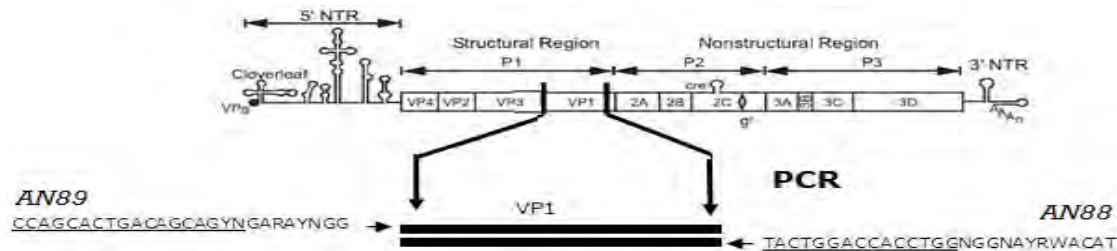
Θετικά δείγματα για την ύπαρξη εντεροϊού				
Κωδ. δείγματος	Αρ. κυττάρων	Περιοχή	Ηλικία	Φύλο
ENY38	182	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	12X	APPEN
ENY60	700	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	4X	APPEN
ENY101	660	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	2ΜΗΝ	APPEN
ENY63	285	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	2X	APPEN
ENY79	400	ΑΘΗΝΑ	3X	ΘΥΛΗ
ENY81	400	ΑΘΗΝΑ	19X	APPEN
ENY82	115	ΑΘΗΝΑ	6X	APPEN
ENY83	-	-	-	-
ENY107	550	ΑΘΗΝΑ	65X	APPEN
ENY91	90	ΑΘΗΝΑ	7X	APPEN
ENY31	-	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	9X	ΘΥΛΗ
ENY33	-	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	8X	APPEN
ENY110	480	ΑΘΗΝΑ	8X	ΘΥΛΗ
ENY117	290	ΑΘΗΝΑ	29X	ΘΥΛΗ
ENY119	270	ΑΘΗΝΑ	4X	APPEN
ENY120	240	ΑΘΗΝΑ	4X	APPEN
ENY132	150	ΑΘΗΝΑ	16X	APPEN
ENY142	89	ΑΘΗΝΑ	9X	APPEN
ENY147	67	ΑΡΤΑ	5X	APPEN
ENY149	-	ΑΘΗΝΑ	11X	ΘΥΛΗ
ENY18	-	-	-	-
ENY23	700	ΑΘΗΝΑ	4ΜΗΝ	APPEN

Πίνακας 11: Θετικά δείγματα που ανιχνεύθηκαν για την παρουσία εντεροϊών.

4.2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ VP1 ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Τα 22 δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά για την ύπαρξη εντεροϊών αναλύθηκαν περαιτέρω για την ταυτοποίηση του στελέχους του εντεροϊού μέσω αλληλούχησης της VP1 περιοχής. Για το σκοπό αυτό το RNA που εκχυλίστηκε από τα δείγματα μετατράπηκε σε cDNA με την μέθοδο αντίστροφη μεταγραφής (M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση,

Promega). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και *auto nested PCR* για την ενίσχυση της περιοχής VP1 (2602–2951nt) με την χρήση των εκκινητών AN89/AN88.



Εικόνα 22: Σχηματική παρουσίαση των περιοχών στις οποίες είναι συμπληρωματικοί οι εκκινητές AN89/AN88 (Rifqiyah Nur Umami1 et al., 2009).

Από τα 22 αρχικά θετικά δείγματα με τα εκκινητικά μόρια UG52 και UC53 αποτελέσματα έδωσαν μόνο τα 7 στη VP1 γενωμική περιοχή με το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88 (Πίνακας 12). Χρησιμοποιείται η περιοχή του γονιδίου VP1 γιατί η αλληλούχηση του 5'UTR δεν δίνει σαφή αποτελέσματα σχετικά με την ταυτοποίηση του ορότυπου του εντεροϊού (Iizuka et al, 1987, Inoue et al, 1989, Jenkins et al, 1987, Kapsenberg, J. et al., 1988, Siafakas et al., 2004). Τα δείγματα που εντοπίστηκαν θετικά για το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88 παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Ενίσχυση της περιοχής VP1 (2602–2951 nt)						
Κωδ. δείγματος	Αρ. κυττάρων	Περιοχή	Ηλικία	Χρονολογία απομόνωσης	Φύλο	Ορότυπος
ENY18	–	–	–	2008	–	Echo ιός 6
ENY23	700	ΑΘΗΝΑ	4ΜΗΝ	2009	ΑΡΡΕΝ	Echo ιός 13
ENY82	115	ΑΘΗΝΑ	6Χ	2010	ΑΡΡΕΝ	Echo ιός 30
ENY91	90	ΑΘΗΝΑ	7Χ	2010	ΑΡΡΕΝ	Echo ιός 9
ENY101	660	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	2ΜΗΝ	2011	ΑΡΡΕΝ	Echo ιός 9
ENY132	150	ΑΘΗΝΑ	16Χ	2011	ΑΡΡΕΝ	Echo ιός 13
ENY30	810	ΑΘΗΝΑ	6Χ	2009	ΘΥΛΗ	Echo ιός 30

Πίνακας 12: Θετικά δείγματα που ανιχνεύτηκαν με την χρήση των εκκινητών AN89/AN88.

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης και έπειτα από την ομοπαράθεση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των κλώνων διαπιστώθηκε ότι οι κλώνοι του ίδιου δείγματος δεν ήταν απόλυτα όμοιοι μεταξύ τους. Από τις ομοπαράθεσεις αυτές μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι κλώνοι ENY18_1, ENY18_2 είναι echo ιοί 6 με 99% ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ τους. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρούμε ότι οι κλώνοι ENY18_1, ENY18_2 έχουν 86–87% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος d' Amori, αντίστοιχα. Η

αμινοξική ομοπαράθεση αντιστοιχεί στην περιοχή της VP1 πρωτεΐνης 50–145. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η μόνη διαφορά ανάμεσα στους κλώνους ENY18_1 και ENY18_2 είναι το αμινοξύ 59 από Αργινίνη σε Γλυκίνη (Πίνακας 13).

Αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων ENY18_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 6												
	54	56	59	84	94	98	101	102	131	132	138	140
ENY18_1	K	Y	R	D	V	R	A	Q	R	Q	A	I
ENY18_2	K	Y	G	D	V	R	A	Q	R	Q	A	I
Echo6_prototype	R	F	R	T	I	K	R	R	K	R	V	T

Πίνακας 13: Αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους κλώνους ENY18_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 6. Με κόκκινη επισήμανση παρουσιάζονται τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων του ίδιου δείγματος.

Παρατηρούμε επίσης ότι οι κλώνοι ENY101_1, ENY101_2 και ENY91_2 είναι echo ιοί 9 με 97% ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ τους οι δυο πρώτοι, 96% αμινοξική ομολογία οι ENY101_1 και ENY101_2 και 92% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Barty. Η αμινοξική ομοπαράθεση αντιστοιχεί στην περιοχή της VP1 πρωτεΐνης 28–153. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η διαφορά μεταξύ των κλώνων ENY101_1 και ENY101_2 είναι το αμινοξύ 33 από Αλανίνη σε Βαλίνη, στο αμινοξύ 100 από Γλυκίνη σε Αργινίνη και στο αμινοξύ 146 από Φενυλανανίνη σε Τυροσίνη (Πίνακας 14).

Αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων ENY101_1 και 2, ENY91_2 και του πρότυπου στελέχους Echo 9														
	33	35	37	41	84	100	105	109	131	132	133	146	147	153
ENY101_1	A	T	H	V	N	G	I	C	S	T	V	F	V	V
ENY101_2	V	M	R	V	N	R	I	C	S	T	V	Y	V	V
ENY91_2	V	I	H	M	N	R	M	F	S	T	V	Y	I	V
Echo13_prototype	A	T	H	V	D	R	M	C	G	S	I	Y	I	F

Πίνακας 14: Αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους κλώνους ENY101_1 και 2, ENY91_2 και του πρότυπου στελέχους Echo 9. Με κόκκινη επισήμανση παρουσιάζονται τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων του ίδιου δείγματος.

Οι κλώνοι ENY23_1, ENY23_2 και ENY32_1, ENY_32_2 είναι echo ιοί 13 με 98% και 96% ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ τους, αντίστοιχα. Οι ENY23_1, ENY23_2 έχουν ποσοστό αμινοξικής ομολογίας 91% με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen και οι ENY32_1 και ENY32_2 90% σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen. Στην πρωτεϊνική ομοπαράθεση χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα 28–153 της πρωτεΐνης VP1. Μια σημαντική διαφορά των κλώνων αυτών σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος είναι η αλλαγή στο αμινοξύ 152 σε Προλίνη από Αλανίνη του πρότυπου στελέχους (Πίνακας 15). Στις αλληλουχίες ENY23_1, ENY23_2 και ENY32_1, ENY_32_2 το υδρόφοβο αμινοξύ Αλανίνη του πρότυπου

στελέχους μετατρέπεται σε Προλίνη, ένα αμινοξύ που συνήθως βρίσκεται στις στροφές τις δευτεροταγής δομής των πρωτεϊνών.

Αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων ENY23_1 και 2, ENY32_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 13																		
	29	33	35	54	56	64	73	80	100	101	113	122	133	134	137	146	147	152
ENY23_1	A	A	M	L	R	I	C	D	V	A	Y	F	Q	S	A	F	V	P
ENY23_2	A	A	T	L	R	I	C	D	V	A	Y	F	Q	S	A	F	I	P
ENY32_1	A	V	T	L	R	I	C	D	V	V	H	F	Q	S	A	Y	M	P
ENY32_2	A	A	T	L	R	I	F	V	V	A	Y	V	Q	S	A	Y	V	P
Echo13_prototype	M	A	T	V	Q	V	C	D	A	A	Y	F	K	R	T	Y	V	A

Πίνακας 15: Αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους κλώνους ENY23_1 και 2, ENY32_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 13. Με κόκκινη επισήμανση παρουσιάζονται τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων του ίδιου δείγματος.

Οι κλώνοι ENY30_1, ENY30_2 και ENY82_1, ENY_82_2 είναι echo ιοί 30 με 98% και 96% ποσοστά νουκλεοτιδικής ομολογίας μεταξύ τους, αντίστοιχα. Στην πρωτεϊνική ομοπάραθεση χρησιμοποιήθηκαν τα αμινοξέα 28–153 των VP1 πρωτεϊνών. Οι ENY30_1, ENY30_2 έχουν αμινοξική ομολογία 91% μεταξύ τους και 90% με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen. Οι κλώνοι ENY82_1 και ENY82_2 90% και 91% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen, αντίστοιχα. Και εδώ παρουσιάζεται η αλλαγή στο αμινοξύ 152 σε Γλουταμίνη από Προλίνη που έχει το πρότυπο στέλεχος. Στην αλληλουχία του ENY82_1 υπάρχει το πολικό αμινοξύ Γλουταμίνη αντί για Προλίνη που έχουν οι άλλοι κλώνοι και το πρότυπο στέλεχος (Πίνακας 16).

Αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων ENY30_1 και 2, ENY82_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 30																		
	33	35	55	63	64	77	83	86	104	117	129	131	132	144	146	147	152	153
ENY30_1	A	T	Y	I	E	Q	V	E	R	L	T	T	T	V	Y	V	P	V
ENY30_2	A	T	Y	I	E	Q	V	E	R	L	T	T	T	V	F	V	P	V
ENY82_1	V	I	Y	I	E	Q	V	E	R	R	S	T	T	V	Y	I	Q	G
ENY82_2	V	I	Y	I	E	Q	V	E	G	L	T	T	T	V	Y	V	P	V
Echo30_prototype	V	T	F	L	Q	H	A	D	R	L	T	N	R	I	Y	V	P	I

Πίνακας 16: Αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους κλώνους ENY30_1 και 2, ENY82_1 και 2 και του πρότυπου στελέχους Echo 30. Με κόκκινη επισήμανση παρουσιάζονται τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των κλώνων του ίδιου δείγματος.

4.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ

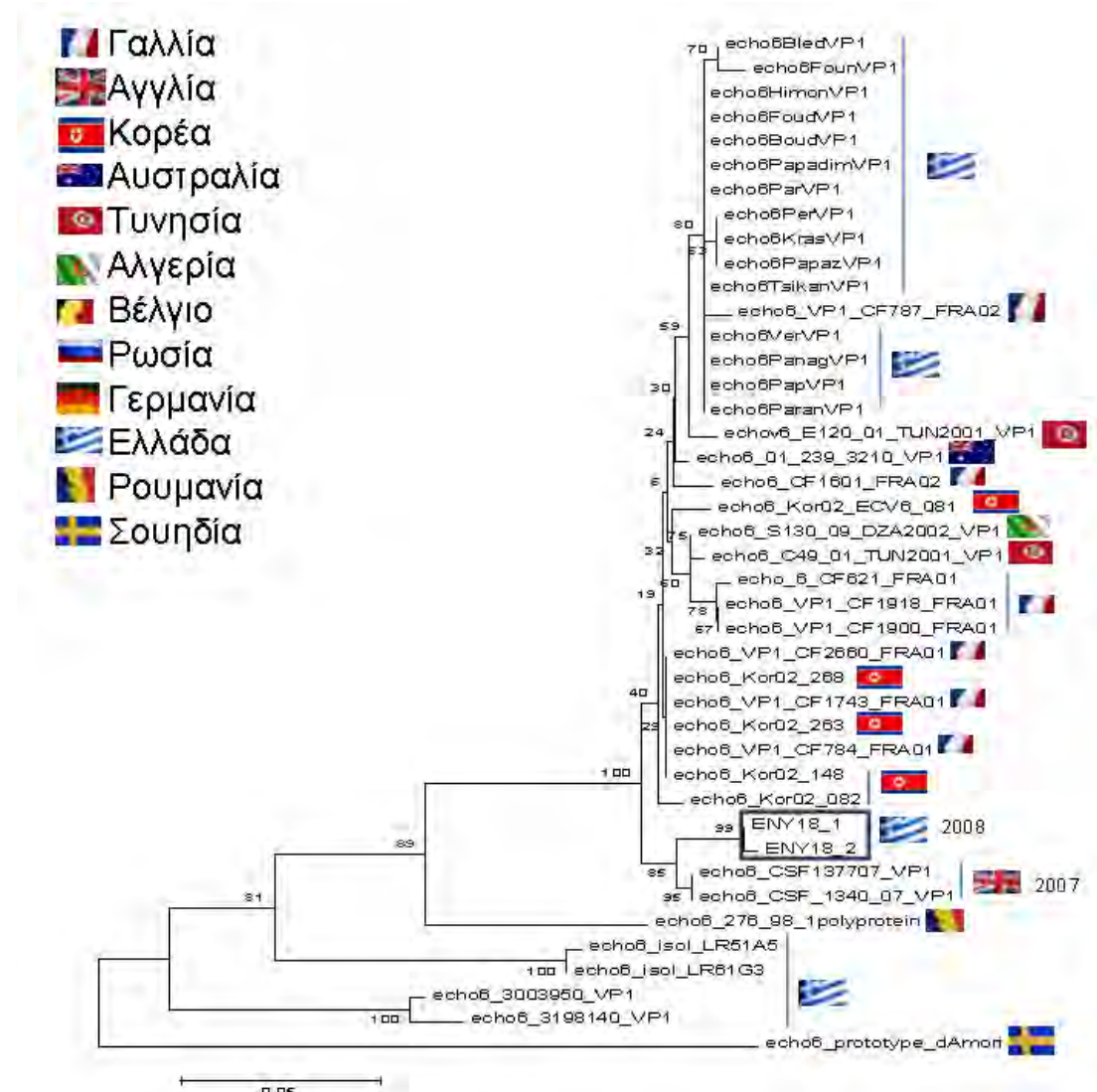
Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένες αλληλουχίες των στελεχών 6, 9, 13 και 30 των echo ιών που έχουν απομονωθεί στην Ελλάδα. Επίσης, με την χρήση του προγράμματος Blast βρέθηκαν οι πιο όμοιες αλληλουχίες σε σχέση με τους κλώνους που αλληλουχήθηκαν σε αυτή την εργασία. Ακολουθούν πίνακες που παρουσιάζουν τις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για

την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων καθώς και επιπλέον πληροφορίες για τις αλληλουχίες αυτές (πίνακες 17–20) και τα φυλογενετικά δέντρα για κάθε ορότυπο (Εικόνες 23–29).

Όνομα αλληλουχίας	Seq ID	Max ident	Χώρα απομόνωσης	Χρονολογία απομόνωσης
Αποτελέσματα Blast				
echo6_CSF137707_VP1	FJ525901.1	98%	Αγγλία (Εδιμβούργο)	2007
echo6_CSF_1340_07_VP1	FJ525897.1	98%	Αγγλία (Εδιμβούργο)	2007
echo6_VP1_CF2660_FRA01	FN688519.1	97%	Γαλλία	2001
echo6_VP1_CF1743_FRA01	FN688514.1	97%	Γαλλία	2001
echo6_VP1_CF784_FRA01	FN688512.1	97%	Γαλλία	2001
echo6_Kor02_268	HM048847.1	97%	Κορέα	2002
echo6_Kor02_148	HM048846.1	97%	Κορέα	2002
echo6_Kor02_263	HM048848.1	97%	Κορέα	2002
echo6_01_239_3210_VP1	GU142886.1	96%	Αυστραλία	2001
echo6_S130_09_DZA2002_VP1	HQ674727.1	96%	Αλγερία	2002
echo6_Kor02_082	HM048843.1	96%	Κορέα	2002
echo6_E120_01_TUN2001_VP1	HQ674737.1	96%	Τυνησία	2001
echo6_VP1_CF787_FRA02	FN691460.1	96%	Γαλλία	2002
echo6_VP1_CF1918_FRA01	FN688517.1	96%	Γαλλία	2001
echo6_VP1_CF1900_FRA01	FN688515.1	96%	Γαλλία	2001
echo6_CF1601_FRA02	FN691461.1	96%	Γαλλία	2002
echo_6_CF621_FRA01	FN691459.1	96%	Γαλλία	2001
echo6_Kor02-ECV6-081so	HM048844.1	96%	Κορέα	2002
echo6_C49.01.TUN2001	HQ674734.1	96%	Τυνησία	2001
echo6_S127.09.DZA2002	HQ674725.1	96%	Αλγερία	2002
echo6_BE02-3828	AY342820.1	95%	Βέλγιο	2002
echo6_E6-F-177-12/V.Nov.Vacha/RU/2011	JX139829.1	94%	Ρωσία (Vacha)	2011
echo6_CF230052-06	AM711096.1	94%	Γαλλία	2006
echo6_Germany/120/2003	AY956571.1	94%	Γερμανία	2003
echo6_E6-F-175-12/V.Nov.KrasnieBaki/RU/2011	JX139828.1	93%	Ρωσία (Krasnie Baki)	2011
Πρότυπο Στέλεχος				
echo6_prototype_dAmori	AF295522.1		Rhode Island	1955
Ελληνικά στελέχη				
echo6HimonVP1	AY612084.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6PapVP1	AY612083.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6PapazVP1	AY534973.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6FoudVP1	AY534971.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6FounVP1	AY697455.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6ParanVP1	AY534967.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6PerVP1	AY500192.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6_3003950_VP1	HM752807.1	96%	Ελλάδα	2005
echo6_3198140_VP1	HM752810.1	96%	Ελλάδα	2005
echo6BoudVP1	AY754947.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6VerVP1	AY700786.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6PanagVP1	AY700785.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6_276_98_1 polyprotein	AY961081.2	96%	Ρουμανία	1998
echo6BledVP1	AY500189.1	96%	Ελλάδα	2001

echo6ParVP1	AY500191.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6PapadimVP1	AY534966.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6KrasVP1	AY534970.1	96%	Ελλάδα	2001
echo6TsikanVP1	AY534972.1	96%	Ελλάδα	2001
Περιβαλλοντικά ελληνικά στελέχη				
echo6_isol_LR51A5	HM852754.1		Ελλάδα (Λάρισα)	2006
echo6_isol_LR61G3	HM852755.1		Ελλάδα (Λάρισα)	2006
Στελέχη εργασίας				
ENY18_1			Ελλάδα	2008
ENY18_2			Ελλάδα	2008

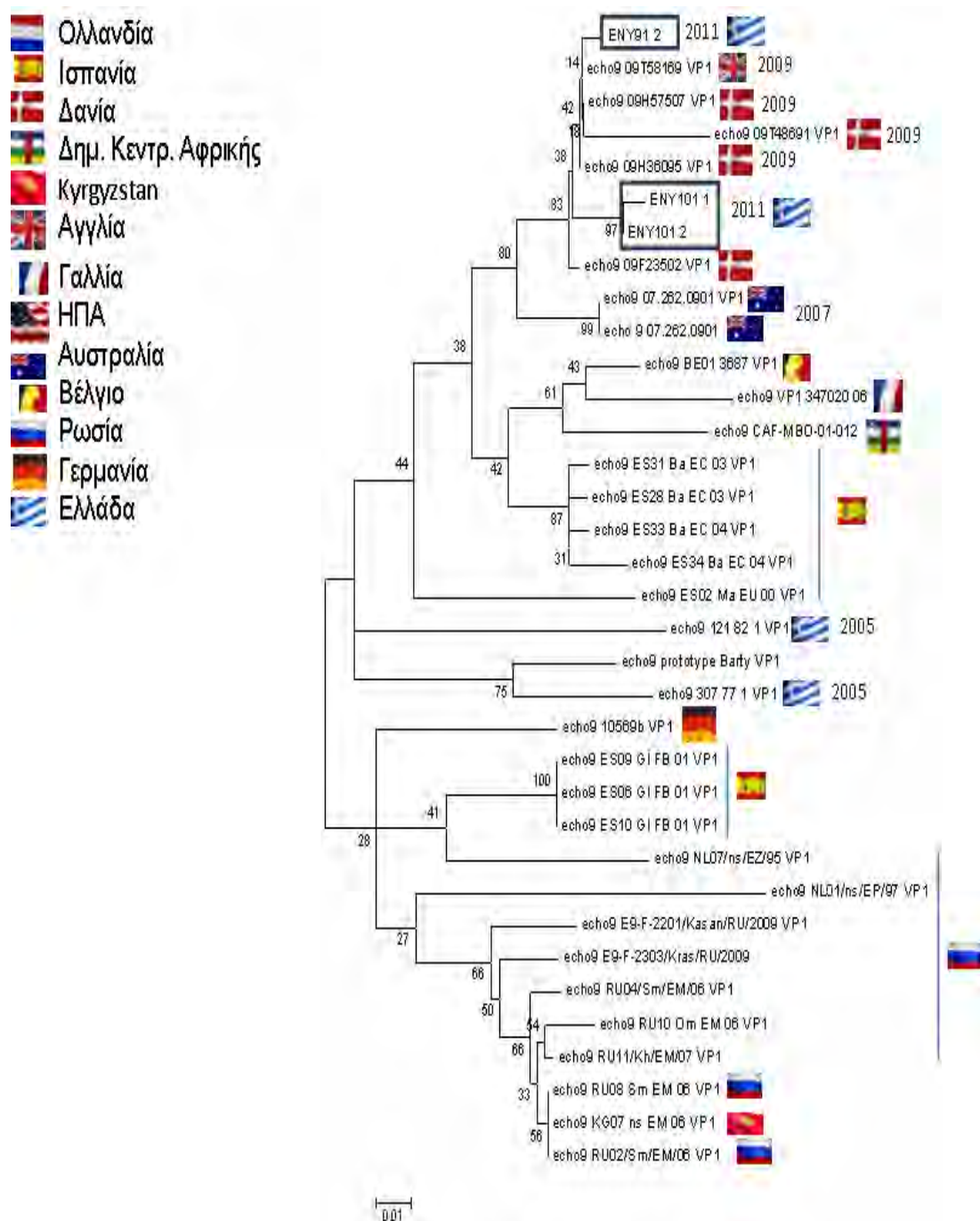
Πίνακας 17: Κώδικες ονομασίες των αλληλουχιών του echo ιού 6, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Παρουσιάζονται ο αριθμός Seq ID, η χώρα προέλευσης και η χρονολογία απομόνωσης των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 6, των κλώνων ENY18_1 και 2 και των ποιο όμοιων αλληλουχιών με τον κλώνο ENY18_1, όπως προκύπτουν από το Blast.



Εικόνα 23: Φυλογενετικό δέντρο των ελληνικών στελεχών echo 6, των κλώνων ENY18_1 και 2 (νουκλεοτίδια 159-436 του VP1 γονιδίου). Παρουσιάζονται οι χώρες προέλευσης των αλληλουχιών.

Όνομα αλληλουχίας	Seq ID	Max ident	Χώρα απομόνωσης	Χρονολογία απομόνωσης
Αποτελέσματα Blast				
echo9_09T58169_VP1	JX009118.1	97%	Αγγλία	2009
echo9_07.262.0901_VP1	GU232810.1	92%	Αυστραλία	2007
echo9_09F23502_VP1	JX009088.1	97%	Δανία	2009
echo9_ES31_Ba_EC_03_VP1	GU393571.1	91%	Ισπανία	2003
echo9_ES28_Ba_EC_03_VP1	GU393569.1	91%	Ισπανία	2003
echo9_ES33_Ba_EC_04_VP1	GU393573.1	90%	Ισπανία	2004
echo9_ES34_Ba_EC_04_VP1	GU393574.1	89%	Ισπανία	2004
echo9_BE01_3687_VP1	AY342742.1	91%	Βέλγιο	2001
echo9_VP1_347020_06	AM711077.1	91%	Γαλλία	2006
echo9_09H57507_VP1	JX009101.1	97%	Δανία	2009
echo9_ES02_Ma_EU_00_VP1	GU393544.1	88%	Ισπανία	2000
echo9_ES09_GI_FB_01_VP1	GU393551.1	87%	Ισπανία	2001
echo9_ES10_GI_FB_01_VP1	GU393552.1	87%	Ισπανία	2001
echo9_ES06_GI_FB_01_VP1	GU393548.1	87%	Ισπανία	2001
echo9_09H36095_VP1	JX009099.1	97%	Δανία	2009
echo9_RU10_Om_EM_06_VP1	GU393626.1	87%	Ρωσία	2006
echo9_RU08_Sm_EM_06_VP1	GU393624.1	87%	Ρωσία	2006
echo9_KG07_ns_EM_06_VP1	GU393623.1	87%	Kyrgyzstan	2006
echo_9_07.262.0901	GU232810.1	92%	Αυστραλία	2007
echo9_CAF-MBO-01-012	JN255657.1	90%	Δημοκρατία της Κεντρικής Αφρικής (Mbomou)	2012
echo9_10477b_VP1	AY919462.1	87%	ΗΠΑ	2006
echo9_RU02/Sm/EM/06_VP1	GU393620.1	87%	Ρωσία	2006
echo9_10569b_VP1	AY919558.1	86%	ΗΠΑ	2006
echo9_RU11/Kh/EM/07_VP1	GU393627.1	87%	Ρωσία	2007
echo9_RU04/Sm/EM/06_VP1	GU393622.1	87%	Ρωσία	2006
echo9_E9-F-2201/Kasan/RU/2009_VP1	GU727603.1	87%	Ρωσία	2009
echo9_09T48691_VP1	JX009116.1	95%	Δανία	2009
echo9_E9-F-2303/Kras/RU	HM032128.1	86%	Ρωσία	2003
echo9_NL07/ns/EZ/95_VP1	GU393616.1	84%	Ολλανδία	1995
echo9_NL01/ns/EP/97_VP1	GU393610.1	84%	Ολλανδία	1997
Πρότυπο Στέλεχος				
echo9_prototype_Barty_VP1	X92886.1		Ohio	1959
Ελληνικά στελέχη				
echo9_121_82_1_VP1	AY500196.1		Ελλάδα	2005
echo9_307_77_1_VP1	AY500194.1		Ελλάδα	2005
Στελέχη εργασίας				
ENY101_1			Ελλάδα (Ηράκλειο)	2011
ENY101_2			Ελλάδα (Ηράκλειο)	2011
ENY91_2			Ελλάδα (Αθήνα)	2010

Πίνακας 18: Κώδικες ονομασίες των αλληλουχιών του echo ιού 9, ο οποίος χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Παρουσιάζονται ο αριθμός Seq ID, η χώρα προέλευσης και η χρονολογία απομόνωσης των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 9, των κλώνων ENY101_1 και 2 και ENY91_2 και των ποιο όμοιων αλληλουχιών με τον κλώνο ENY101_1, όπως αυτά προκύπτουν από το Blast.

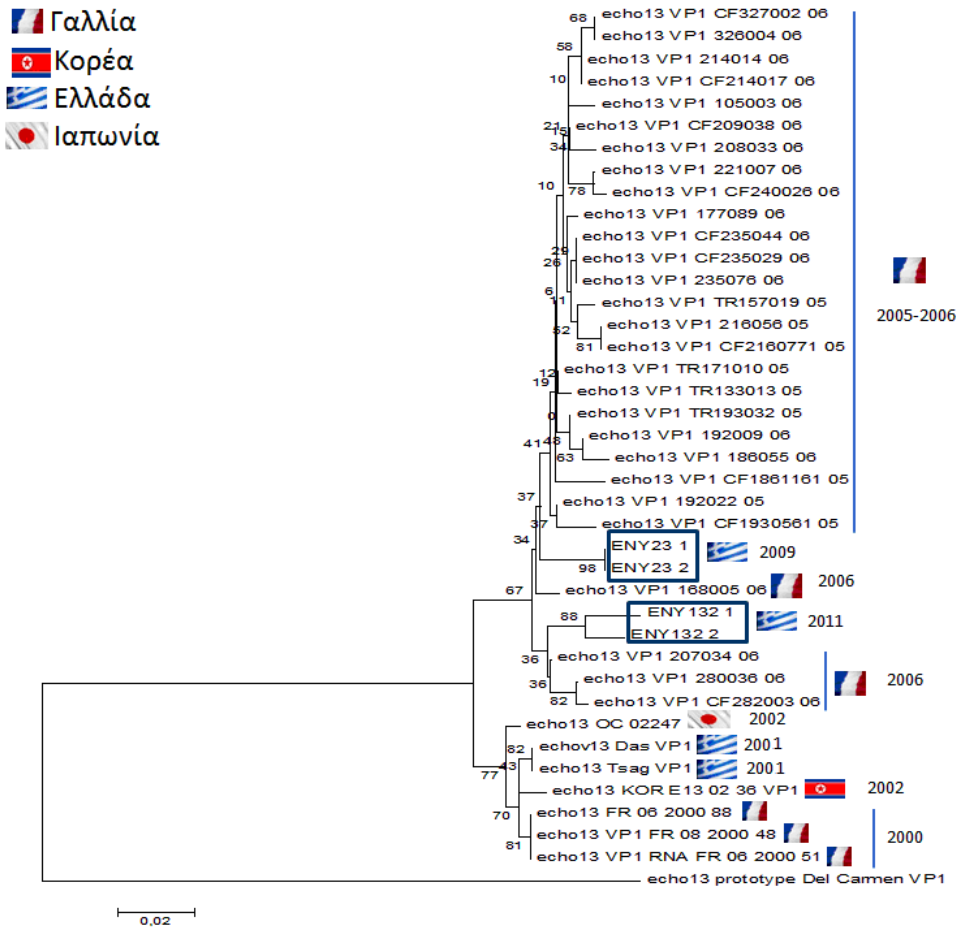


Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο των ελληνικών στελεχών echo 9, των κλώνων ENY101_1 και 2 και ENY91_2 (νουκλεοτίδια 158–180 του VP1 γονιδίου). Παρουσιάζονται οι χώρες προέλευσης των αλληλουχιών.

Όνομα αλληλουχίας	Seq ID	Max ident	Χώρα απομόνωσης	Χρονολογία απομόνωσης
Αποτελέσματα Blast				
Echo13_192022_05	AM711000.3	98%	Γαλλία	2005
Echo13_TR171010-05	AM236982.1	98%	Γαλλία	2005
Echo13_CF235044-06	AM711098.1	98%	Γαλλία	2006
Echo13_235076-06	AM711067.1	98%	Γαλλία	2006
Echo13_CF209038-06	AM711089.1	98%	Γαλλία	2006
Echo13_CF235029-06	AM711097.1	98%	Γαλλία	2006

Echo13_207034-06	AM711059.1	98%	Γαλλία	2006
Echo13_168005-06	AM711042.1	98%	Γαλλία	2006
Echo13_TR193032-05	AM236988.1	98%	Γαλλία	2005
Echo13_TR133013-05	AM236975.1	98%	Γαλλία	2005
Echo13_CF214017-06	AM711092.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_214014-06	AM711062.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_192009-06	AM711051.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_177089-06	AM711044.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_TR157019-05	AM236977.1	97%	Γαλλία	2005
Echo13_CF1930561-05	AM236937.1	97%	Γαλλία	2005
Echo13_216056-05	AM711009.3	97%	Γαλλία	2005
Echo13_CF327002-06	AM711107.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_326004-06	AM711075.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_280036-06	AM711071.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_207034-06	AM711059.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_207033-06	AM711058	97%	Γαλλία	2006
Echo13_221007-06	AM711065.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_105003-06	AM711038.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_CF2160771-05	AM236945	97%	Γαλλία	2005
Echo13_CF282003-06	AM711102.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_CF240026-06	AM711099.1	97%	Γαλλία	2006
Echo13_CF1861161-05	AM236935	97%	Γαλλία	2005
Echo13_186055-06	AM711049	96%	Γαλλία	2006
Echo13_KOR-E13-02-36	AY268576.1	96%	Κορέα	2002
Echo13_OC/02247	AB178771.1	96%	Ιαπωνία	2002
Echo13_FR-06-2000-88	AM492400.1	96%	Γαλλία	2000
Echo13_FR-08-2000-48	AM492397.1	96%	Γαλλία	2000
Echo13_FR-06-2000-51	AM492381.1	96%	Γαλλία	2000
echo13_S3(1)-1	AB501332.1	94%	Ιαπωνία (Toyama)	2002
echo13_CF1393-00	AJ537606.1	94%	Γαλλία	2000
echo13_KOBE/0759/01	AB112409.1	94%	Ιαπωνία (Kobe city)	2001
echo13_FukuokaCity02-216	AB109386.1	95%	Ιαπωνία (Fukuoka City)	2002
echo13_01.114.1428	GU142896.1	93%	Αυστραλία	2001
Πρότυπο Στέλεχος				
echo13_Del_Carmen_VP1	AF081327.1		Philippines	1953
Ελληνικά στελέχη				
echov13_Das_VP1	AY500188.1		Ελλάδα	2001
echo13_Tsag_VP1	AY500184.1		Ελλάδα	2001
Στελέχη εργασίας				
ENY23_1			Ελλάδα (Αθήνα)	2009
ENY23_2			Ελλάδα (Αθήνα)	2009
ENY132_1			Ελλάδα (Αθήνα)	2011
ENY132_2			Ελλάδα (Αθήνα)	2011

Πίνακας 19: Κώδικες ονομασίες των αλληλουχιών του echo ιού 13, ο οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Παρουσιάζονται ο αριθμός Seq ID, η χώρα προέλευσης και η χρονολογία απομόνωσης των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 13, των κλώνων ENY132_1 και 2 και ENY23_1 και 2 και των σαράντα πιο όμοιων αλληλουχιών με τον κλώνο ENY23_1 όπως προκύπτουν από το Blast.

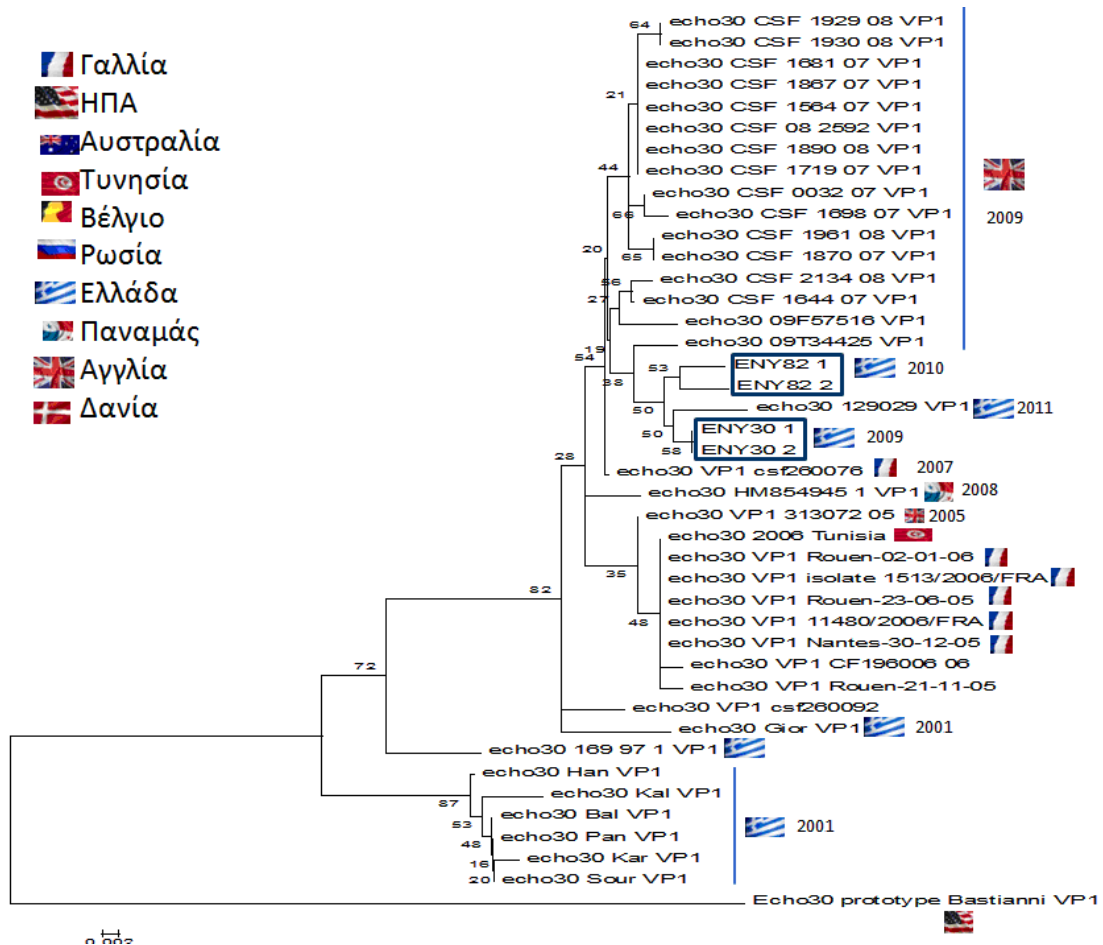


Εικόνα 25: Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 13, των κλώνων ENY132_1 και 2 και ENY23_1 και 2 (νουκλεοτίδια 127-421 του VP1 γονιδίου). Παρουσιάζονται οι χώρες προέλευσης των αλληλουχιών και οι ημερομηνίες απομόνωσης.

Όνομα αλληλουχίας	Seq ID	Max ident	Χώρα απομόνωσης	Χρονολογία απομόνωσης
Αποτελέσματα Blast				
echo30_CSF_08_2592_VP1	HQ897651.1	97%	Αγγλία (Εδιμβούργο)	2008
echo30_CSF_1681_07_VP1	FJ525922.1	97%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_1564_07_VP1	FJ525913.1	97%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_2134_08_VP1	FJ525938.1	96%	Αγγλία	2008
echo30_CSF_1961_08_VP1	FJ525934.1	96%	Αγγλία	2008
Echo30_CSF_1929_08_VP1	FJ525933.1	96%	Αγγλία	2008
echo30_CSF_1930_08_VP1	FJ525932.1	96%	Αγγλία	2008
echo30_CSF_1870_07_VP1	FJ525930.1	96%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_1867_07_VP1	FJ525929.1	96%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_0032_07_VP1	FJ525889.1	96%	Αγγλία	2007
Echo30_VP1_csf260076	AM946163.1	96%	Γαλλία	2007
echo30_CSF_1719_07_VP1	FJ525926.1	96%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_1698_07_VP1	FJ525924.1	96%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_1644_07_VP1	FJ525919.1	96%	Αγγλία	2007
echo30_CSF_1890_08_VP1	FJ525931.1	96%	Αγγλία	2008
echo30_VP1_313072_05	FJ525931.1	96%	Αγγλία	2005
echo30_09T34425_VP1	JX009112.1	97%	Αγγλία	2009

echo30_2006_Tunisia	JN177732.1	95%	Τυνησία	2006
echo30_VP1_csf260092	AM946162.1	95%	Γαλλία	2007
echo30_VP1_CF196006_06	AM711084.1	95%	Γαλλία	2006
echo30_09F57516_VP1	JX009095.1	95%	Δανία	2009
echo30_VP1_Rouen-02-01-06	FM210460.1	95%	Γαλλία	2006
echo30_VP1_Rouen-23-06-05	FM210047.1	95%	Γαλλία	2005
echo30_HM854945_1_VP1	HM854945.1	95%	Παναμάς	2008
echo30_VP1_Nantes-30-12-05	FM210459.1	95%	Γαλλία	2005
echo30_VP1_Rouen-21-11-05	FM210454.1	95%	Γαλλία	2005
echo30_VP1_1513/2006/FRA	AM937004.1	95%	Γαλλία	2006
echo30_VP1_11480/2006/FRA	AM937005.1	95%	Γαλλία	2006
echo30_iso4_VP1	HM854946.1	95%	Παναμάς	2008
echo30_CF2575-00	AM237324.1	95%	Γαλλία	2000
echo30_E125-01.TUN2001	JN177729.1	94%	Τυνησία	2001
Human enterovirus_B_strain_E30_26346_Khab_06_VP1	EF397656.1	94%	Ρωσία (Khabarovsk)	2006
echo30_VP1_Bru1705/Belgium2000	AM946161.1	94%	Βέλγιο	2000
Human enterovirus_B_E30_23202_VP1	EU280309.1	94%	Ρωσία	2004
Human enterovirusB_E30_26337_Khab_06_VP1	EF397655.1	94%	Ρωσία (Khabarovsk)	2006
Πρότυπο Στέλεχος				
Echo30_prototype_Bastianni_VP1	AF081340.1		ΗΠΑ (New York)	1958
Ελληνικά στελέχη				
echo30_Kar_VP1	AY534965.1		Ελλάδα	2001
echo30_Bal_VP1	AY500190.1		Ελλάδα	2001
echo30_129029_VP1	HQ424439.1		Ελλάδα	2011
echo30_Gior_VP1	AY500187.1		Ελλάδα	2001
echo30_Han_VP1	AY697438.1		Ελλάδα	2001
echo30_Pan_VP1	AY500183.1		Ελλάδα	2001
echo30_Kal_VP1	AY500186.1		Ελλάδα	2001
echo30_Sour_VP1	AY500182.1		Ελλάδα	2001
echo30_169_97_1_VP1	AY902406.1		Ελλάδα	1979
Στελέχη εργασίας				
ENY82_1			Ελλάδα (Αθήνα)	2009
ENY82_2			Ελλάδα (Αθήνα)	2009
ENY30_1			Ελλάδα (Αθήνα)	2011
ENY30_2			Ελλάδα (Αθήνα)	2011

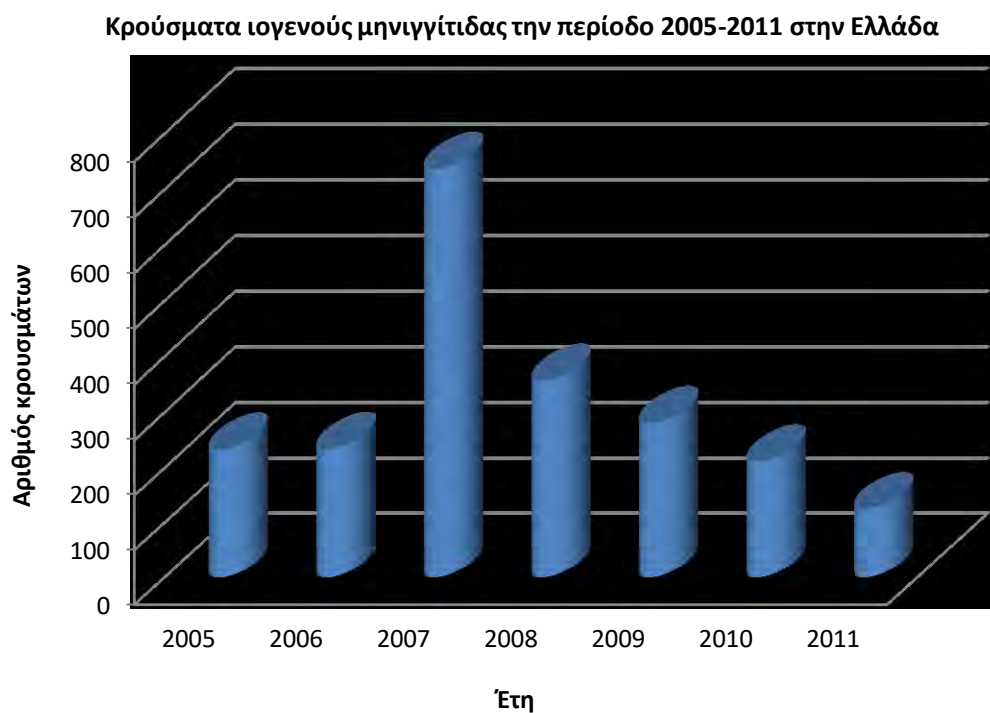
Πίνακας 20: Κώδικες ονομασίες των αλληλουχιών του echo ιού 30, ο οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρο. Παρουσιάζονται ο αριθμός Seq ID, η χώρα προέλευσης και η χρονολογία απομόνωσης των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 30, των κλώνων ENY82_1 και 2 και ENY30_1 και 2 και των είκοσι ποιο όμοιων αλληλουχιών με τον κλώνο ENY82_1.



Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο των αλληλουχιών των ελληνικών στελεχών echo 30, των κλώνων ENY82_1 και 2 και ENY30_1 και 2 (νουκλεοτίδια 140–384 του VP1 γονιδίου). Παρουσιάζονται οι χώρες προέλευσης των αλληλουχιών.

4.5. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ ΤΗΝ ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2005–2011

Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποια δεδομένα από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας για τα κρούσματα μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα την χρονική περίοδο 2005–2011 (μέχρι τον αύγουστο του 2011). Στην γραφική παράσταση της εικόνας 27 παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων ιογενούς μηνιγγίτιδας ανά έτος. Με το όρο ιογενή μηνιγγίτιδα αναφερόμαστε σε μη-βακτηριακή μηνιγγίτιδα με συμπτωματολογία ιογενούς μηνιγγίτιδας. Παρατηρούμε μια έντονη αύξηση των κρουσμάτων ιογενούς μηνιγγίτιδας το 2007 (Εικόνα 27). Η επιλογή των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία έγινε με βάση αυτό το διάγραμμα και καλύπτουν την περίοδο 2007 με 2011.



Εικόνα 27: Γραφική παράσταση του αριθμού των κρουσμάτων ιογενούς μηνιγγίτιδας την χρονική περίοδο 2005-2011 (μέχρι τον αύγουστο του 2011) στη Ελλάδα. Με το όρο ιογενή μηνιγγίτιδα αναφερόμαστε σε μη-βακτηριακή μηνιγγίτιδα με συμπτωματολογία ιογενούς μηνιγγίτιδας.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Picornaviridae και είναι θετικοί μονόκλωνοι RNA ιοί που σχετίζονται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες. Σε ορολογικές μελέτες έχουν διακριθεί περισσότεροι από 66 ορότυποι βασιζόμενοι σε δοκιμές εξουδετέρωσης αντισωμάτων. Με βάση την παθογένεια που προκαλούν στον άνθρωπο και στα ζώα, οι εντεροϊοί κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες: τους πολιοϊούς, τους Coxsackie A, τους Coxsackie B και τους Echo ιούς. Οι εντεροϊοί πλήττουν εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο παγκοσμίως, και ανιχνεύονται συχνά σε αναπνευστικές εκκρίσεις (πχ σάλιο, πτύελα, ρινική βλέννα) και στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου. Όσον αφορά την μηνιγγίτιδα, οι περισσότερες περιπτώσεις της οξείας μορφής της ασθένειας αυτής, οφείλεται κυρίως σε μόλυνση από ιό, με τα βακτήρια, τους μύκητες και τα παράσιτα να αποτελούν τα επόμενα σε συχνότητα αίτια (Ginsberg L, 2004). Οι Echo ιοί 6, 9, 11, 13, 19 και 30 είναι οι πιο κοινοί εντεροϊοί που απομονώνονται από ασθενείς με άσηπτη μηνιγγίτιδα, είτε στην επιδημική είτε στην ενδημική μορφή της ασθένειας (Chadwick DR, 2005). Η 5'UTR περιοχή χρησιμοποιείται για την διάγνωση των Echo ιών, και έχει αποδειχτεί ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτής της περιοχής δεν σχετίζεται με τον ορότυπο (Siafakas N et al., 2002, Siafakas N et al., 2003). Η αντίστροφη μεταγραφή και η αλληλούχηση τμήματος της καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 αποκαλύπτει την σχέση του γονιδιώματος με την κλασική κατηγοριοποίηση των οροτύπων (Oberste MS et al., 1999a, Oberste MS et al., 1999b Kottaridi C et al., 2006). Παρόλο που τα ξεσπάσματα μηνιγγίτιδας συνήθως σχετίζονται με ένα ορότυπο Echo ιού (Frantzidou F et al., 2005, Zhao YN et al., 2006, Akiyoshi K et al., 2007) το πιο κοινό πρότυπο είναι η ενδημική συν-κυκλοφορία από διάφορους ορότυπους (Michos AG et al., 2007, Roth B et al., 2007).

Οι Coxsackie ιοί B5 και οι ιοί Echo 6, 13, 11, 15 ήταν οι κύριοι εντεροϊοί που κυκλοφορούσαν στην Ελλάδα και προκαλούσαν ξεσπάσματα άσηπτης μηνιγγίτιδας κατά την περίοδο 1994–2005 (Dumaidi K et al., 2006, Siafakas N et al., 2004, Frantzidou F et al., 2007, Siafakas N et al., 2001, Papa A et al., 2006). Έχει αναφερθεί ότι οι κυρίαρχοι εντεροϊοί στη Ελλάδα την χρονική περίοδο 2006–2007 ήταν Echo ιοί 6, και έχουν συσχετιστεί με άσηπτη μηνιγγίτιδα (Papa A et al., 2009). Το 2005 αναφέρθηκαν περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας σε παιδιά στη πόλη της Πάτρας στην Ελλάδα, που προκλήθηκαν από μια νέα ποικιλία του Echo ιού 15 (Frantzidou F et al., 2007). Το 2007, για πρώτη φορά συσχετίστηκε κρούσμα άσηπτης μηνιγγίτιδας με το Echo ιό 4 στην Ελλάδα που σχετίζεται με τον Echo ιό 4 στην Ισπανία (Trallero G

et al., 2000) στην Σκωτία (1977–1997) (Nairn C et al., 1999) και το Ισραήλ το 1997 (Handsher R et al., 1999). Παρόλα αυτά, μέχρι το 2000, ο Echo ιός 4 είχε αναφερθεί ότι αντιπροσώπευε ένα σπάνιο ορότυπο σε Ευρωπαϊκές επιδημίες, ενώ οι Echo ιοί 30, 13, 6 και 9 είναι πιο κυρίαρχοι (Cabrerizo M et al., 2008, Richter J et al., 2006, Logotheti M et al., 2009).

Φυλογενετικές μελέτες στη VP1 στα στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν το 2007 έδειξαν ότι οι ορότυποι που ευθύνονται για την επιδημία είναι οι Echo4, 6, 9, 14, 25, Cocksackie A6, A15, A24 και Cocksackie B1 (Logotheti et al., 2009). Όλες οι αλληλουχίες των echo 4 που αναλύθηκαν παρουσίασαν 98.7% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων με Ισπανικά στελέχη echo 4, τα οποία απομονώθηκαν από μηνιγγίτιδες το 2006 (Logotheti et al., 2009). Στην παρούσα εργασία δεν εντοπίστηκε Echo ιός 4 αλλά μόνο 6, 9, 13 και 30. Συγκεκριμένα, το 2008 απομονώθηκε στέλεχος Echo 6 ιού (ENY 18). Από τη φυλογενετική ανάλυση στη VP1 περιοχή (εικόνα 23) φαίνεται να συσχετίζεται με Αγγλικά στελέχη απομονωμένα το 2007.

Στη παρούσα εργασία εξετάστηκαν 158 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ασθενών με πιθανή άσηπτη μηνιγγίτιδα προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία κάποιου εντεροϊού. Με την τεχνική της RT–PCR διαπιστώθηκε η παρουσία εντεροϊών σε 22 από τα 158 δείγματα ενισχύοντας μία περιοχή της 5' αμετάφραστη περιοχής του γονιδιώματος των εντεροϊών η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών. Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό του ορότυπου του εντεροϊού και την κλωνοποίηση της περιοχής VP1 (καψιδιακή πρωτεΐνη) στα 22 θετικά ως προς εντεροϊό δείγματα, πραγματοποιήθηκε RT–PCR στην VP1 γενωμική περιοχή με την χρήση των εκκινητών AN89/AN88, όπου τα 7 δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Το ότι μόνο 7 από τα 22 θετικά δείγματα στην πρώτη PCR βρέθηκαν θετικά και στην PCR με τους εκκινητές AN89/AN88, ενδεχομένως να οφείλεται στην ευμεταβλητότητα της VP1 περιοχής. Ενδεχομένως τα στελέχη της παρούσας μελέτης λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων στη συγκεκριμένη περιοχή να μην αναγνωρίστηκαν από τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχηση των δειγμάτων αυτών και μετά από ανάλυση βρέθηκε ότι η αλληλουχία τους παρουσιάζει ομολογία με τους ορότυπους Echo 6, Echo 9, Echo 13 και Echo 30.

Συγκεκριμένα, οι κλώνοι ENY18_1 και ENY18_2 είναι echo ιοί 6 με 99% νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ τους και 86–87% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος του Echo 6 d' Amori. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα ENY91 και ENY101 ταυτοποιήθηκαν ως

Echo 9 ιοί. Μεταξύ τους παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομοιότητα από 96–97% ενώ η σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος έδειξε πρωτεϊνική ομοιότητα 96% και 92%, αντίστοιχα. Οι κλώνοι ENY101_1, ENY101_2 και ENY91_2 διαφέρουν με το πρότυπο στέλεχος Echo 9 Barty σε αρκετά αμινοξέα όπως φαίνεται στην Πίνακα 14. Οι κλώνοι ENY23_1, ENY23_2 και ENY132_1, ENY_132_2 είναι echo ιοί 13 με 98% νουκλεοτιδική και 96% ομολογία μεταξύ τους, αντίστοιχα. Οι ENY23_1, ENY23_2 έχουν αμινοξική ομολογία 91% με το πρότυπο στέλεχος Echo 13 Del Carmen και οι ENY32_1, ENY32_2 έχουν 90% και 91% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen, αντίστοιχα. Οι κλώνοι ENY23_1, ENY23_2 και ENY32_1, ENY_32_2 διαφέρουν σε πολλές αμινοξικές θέσεις σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Echo 13 Del Carmen (Πίνακας 15). Οι κλώνοι ENY30_1, ENY30_2 και ENY82_1, ENY_82_2 είναι echo ιοί 30. Οι ENY30_1, ENY30_2 έχουν αμινοξική ομολογία 91% και 90% με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen και οι ENY82_1 και ENY82_2 90% και 91% αμινοξική ομολογία σε σχέση με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen, αντίστοιχα. Η σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με το πρότυπο στέλεχος αποκάλυψε αρκετές αμινοξικές διαφορές (Πίνακας 16). Συνολικά, παρατηρούμε ότι οι περισσότεροι κλώνοι που απομονώθηκαν από ίδιο άτομο διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους (96–99%). Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στη ύπαρξη *quasispecies* του ιού στα άτομα αυτά. Έχει αναφερθεί, ότι κατά την διάρκεια μιας μόλυνσης από Echo ιό, μπορούν να απομονωθούν από το ίδιο άτομο ιοί που παρουσιάζουν γενετική ποικιλομορφία σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος. Η γενετική αυτή ποικιλομορφία του ιού στο ίδιο άτομο (*quasispecies*) που παρατηρείται μεταξύ διαδοχικών δειγμάτων μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικά γενετικά χαρακτηριστικά και ικανότητα αντιγραφής σε κυτταρικές σειρές (Baily JL, 2000). Βέβαια δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η διαφορά μεταξύ των κλώνων να οφείλεται σε λάθος της πολυμεράσης κατά την ενίσχυση της VP1 γενωμικής περιοχής με PCR.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στην VP1 περιοχή οι οποίες να συσχετίζονται με μολυσματικότητα. Οι Gaggana et al. αναφέρουν ότι μεταλλάξεις στην VP1 γονιδιακή περιοχή σχετίζονται με την μολυσματικότητα του CB4-V ιού, συγκρίνοντας ανασυσδυασμένους ιούς και τη μολυσματικότητα που αυτοί έχουν σε ποντίκια. Οι ερευνητές αυτοί βρήκαν ότι το αμινοξύ Θρεονίνη 129 στην VP1 πρωτεΐνη σχετίζεται με την μολυσματικότητα του ιού αυτού (Gaggana et al., 1993). Επιπλέον, οι Gullberg et al. αναφέρουν ότι μια αμινοξική αλλαγή στην VP1 πρωτεΐνη του CVB2 ιού (Γλουταμίνη σε Λυσίνη στη θέση 164) σχετίζεται με την κυτταρική λύση και απόπτωση που προκαλεί ο CVB2 σε RD κύτταρα (κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος) (Gullberg et al., 2010). Έχει αναφερθεί

επίσης, ότι η αμινοξική αλλαγή στη θέση 152 σε Σερίνη (αμινοξύ με πολική ομάδα) από Βαλίνη (υδρόφοβο αμινοξύ) συσχετίζεται με το ξέσπασμα άσηπτης μηνιγγίτιδας την Ταϊβάν το 2006 από τον ιό Echo 18 (Tsai HP et al., 2011). Στις αλληλουχίες των κλώνων ENY23_1, ENY23_2 και ENY132_1, ENY_132_2 (Echo ιοί 13) το υδρόφοβο αμινοξύ Αλανίνη στη θέση 152 του πρότυπου στελέχους μετατρέπεται σε Προλίνη, ένα αμινοξύ που συνήθως βρίσκεται στις στροφές της δευτεροταγής δομής των πρωτεϊνών. Επίσης, στον κλώνο ENY82_1 παρουσιάζεται η αλλαγή στο αμινοξύ 152 σε Προλίνη από Γλουταμίνη που έχει το πρότυπο στέλεχος και οι υπόλοιποι κλώνοι. Η μετάλλαξη αυτή ίσως να σχετίζεται με την άσηπτη μηνιγγίτιδα της παρούσας εργασίας. Τα παραπάνω στοιχεία καταδεικνύουν την σημαντικότητα των μεταλλάξεων οι οποίες πιθανώς να είναι υπεύθυνες για το ξέσπασμα άσηπτης μηνιγγίτιδας.

Για την επιδημιολογική μελέτη των εντεροϊών χρησιμοποιούνται φυλογενετικά δέντρα για την VP1 γενομική περιοχή (Mirand et al. 2006, Pliaka et al., 2007, Bolanaki et al., 2008, Chu et al., 2010, Tryfonos et al., 2011, Kyriakoulou Z et al., 2013). Τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν στη παρούσα εργασία μας δίνουν αρκετές πληροφορίες για την πιθανή συσχέτιση των στελεχών της παρούσας εργασίας με στελέχη που απομονώθηκαν στην Ελλάδα σε παλαιότερες επιδημίες καθώς και με και άλλα στελέχη που κυκλοφόρησαν παγκοσμίως.

Το φυλογενετικό δέντρο του Echo ιού 6 της εικόνας 23 μας δίνει αρκετές πληροφορίες για την επιδημιολογία του ιού Echo 6, ENY18 που χαρακτηρίστηκε σε αυτή την εργασία. Το στέλεχος ENY18 απομονώθηκε το 2008 και ομαδοποιείται με στελέχη από την Αγγλία τα οποία απομονώθηκαν ένα χρόνο νωρίτερα (2007). Τα υπόλοιπα Ελληνικά στελέχη του δέντρου ομαδοποιούνται ξεχωριστά και σε δυο διαφορετικές ομάδες. Όπως φαίνεται στο δέντρο ελληνικά στελέχη που απομονώθηκαν το 2001 ομαδοποιούνται με στελέχη που απομονώθηκαν την ίδια χρονική περίοδο σε χώρες όπως στη Γαλλία, στην Κορέα, στην Αυστραλία, στην Αλγερία και στην Τυνησία, αποκαλύπτοντας μια παγκόσμια εξάπλωση των στελεχών αυτών την περίοδο 2001–2002 (Hye-Jin Kim et al., 2012). Τέλος, δυο επιπλέον ελληνικά στελέχη που απομονώθηκαν το 2005 ομαδοποιούνται ξεχωριστά και μαζί με περιβαλλοντικά ελληνικά στελέχη απομονωμένα το 2006. Τα δεδομένα αυτά μας αποκαλύπτουν ότι στελέχη του Echo 6 ιού εισήλθαν στην Ελλάδα το 2001. Το 2005–2006 φαίνεται να υπάρχει μια νέα είσοδος στελεχών Echo 6 στην Ελλάδα (Papa A et al., 2009) και τέλος άλλη μια το 2008, μεταξύ των οποίων και το στέλεχος ENY18.

Ο Echo 9 ιός σχετίζεται με εκτεταμένα, μεγάλης κλίμακας εποχιακά ξεσπάσματα και εμφανίζει ένα συνηθισμένο επιδημικό πρότυπο που συμβαίνει κάθε 3 χρόνια (Dalwai A et al., 2009, Khetsuriani N et al., 2006). Το φυλογενετικό δέντρο του Echo ιού 9 της εικόνας 24 μας δίνει αρκετές πληροφορίες για την επιδημιολογία των στελεχών του ιού Echo 9, ENY91 και ENY101 που απομονώθηκαν σε αυτή την εργασία. Τα στελέχη αυτά, τα οποία απομονώθηκαν το 2011, ομαδοποιούνται μαζί με στελέχη από Αγγλία και Δανία τα οποία απομονώθηκαν τρία χρόνια νωρίτερα (2009). Τα υπόλοιπα Ελληνικά στελέχη του δέντρου τα οποία απομονώθηκαν το 2005 φαίνεται να ομαδοποιούνται ξεχωριστά κάτι που υποδεικνύει δυο διαφορετικές εισόδους στελεχών Echo 9 στη Ελλάδα, μια το 2005, και μια το 2011. Από το δέντρο αυτό θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα στελέχη ENY101 και 91 συσχετίζονται με στελέχη που κυκλοφόρησαν στην Αυστραλία (2007) την Αγγλία (2009) και την Δανία (2009). Επιπλέον, όλα τα ελληνικά στελέχη του δέντρου ομαδοποιούνται ξεχωριστά από στελέχη στη Ρωσία (2009) τα οποία ευθύνονται για κρούσματα άσηπτης μηνιγγίτιδας την περίοδο 2007–2009 (Golitsyna LN et al., 2011).

Το φυλογενετικό δέντρο του Echo ιού 13 της εικόνας 25 μας δίνει αρκετές πληροφορίες για την επιδημιολογία των στελεχών ENY23 και ENY 132 που απομονώθηκαν στην εργασία αυτή. Το στέλεχος ENY23 απομονώθηκε το 2009 και ομαδοποιείται με στελέχη προερχόμενα αποκλειστικά από Γαλλία και απομονωμένα την χρονική περίοδο 2005–2006. Το στέλεχος ENY132, το οποίο απομονώθηκε το 2011, ομαδοποιείται με διαφορετικά στελέχη από την Γαλλία (απομονωμένα το 2006). Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν δυο εισόδους διαφορετικών στελεχών Echo 13 στη Ελλάδα, μια το 2009 και μια το 2011, από διαφορετικά στελέχη που κυκλοφορούσαν στη Γαλλία το 2006. Τα υπόλοιπα ελληνικά στελέχη του δέντρου (απομονωμένα το 2001) ομαδοποιούνται ξεχωριστά μαζί με στελέχη που κυκλοφορούσαν στην Κορέα (2002) (Iwai M et al., 2010), στην Γαλλία (2000) και στη Ιαπωνία (2002). Στο δέντρο αυτό φαίνεται ξεκάθαρα η χρονική συσχέτιση των Echo13 στελεχών. Παρατηρούμε στην Ευρώπη δυο επιδημίες μια το 2000–2002 (Γαλλία) και μια το 2006–2011 (Γαλλία). Συνολικά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι πραγματοποιήθηκαν δυο είσοδοι διαφορετικών στελεχών Echo 13 στη Ελλάδα, μια το 2001, μια το 2009–2011.

Το φυλογενετικό δέντρο του Echo ιού 30 της εικόνας 26 μας δίνει αρκετές πληροφορίες για την επιδημιολογία των στελεχών του ιού Echo 30 ENY82 και ENY30, που απομονώθηκαν σε αυτή την εργασία. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν το 2010 και 2011 και ομαδοποιούνται με το ελληνικό στέλεχος 129029 echo9 απομονωμένο το 2011. Πρόσφατα,

αναφέρθηκαν κρούσματα άσηπτης μηνιγγίτιδας στη Ελλάδα (Θράκη) το οποίο προκλήθηκε από ξέσπασμα Echo 30 ιού (Mantadakis E et al., 2013). Την χρονική περίοδο 2007–2008 παρόμοια στελέχη φαίνεται να κυκλοφορούν και στην Αγγλία. Τα στελέχη αυτά ομαδοποιούνται με στέλεχος απομονωμένο στο Παναμά το 2008, όπου είχε παρατηρηθεί έξαρση άσηπτης μηνιγγίτιδας από τον ιό Echo 30 (Martinez AA eta I., 2012). Τα υπόλοιπα ελληνικά στελέχη του δέντρου ομαδοποιούνται ξεχωριστά. Τα στελέχη αυτά είναι όλα απομονωμένα το 2001. Ο Echo ιός 30 είναι ένας από τους πιο συχνούς Echo ιούς που απομονώνονται, και προκαλεί άσηπτη μηνιγγίτιδα σε περιοχές με εύκρατα κλίματα (Palacios G et al., 2002). Ο Echovirus 30 έχει προκαλέσει μεγάλες επιδημίες άσηπτης μηνιγγίτιδας σε πολλές περιοχές του κόσμου τα τελευταία 40 χρόνια. Δεδομένα από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής την περίοδο 1961 έως 1998 δείχνουν ότι το ετήσιο ποσοστό απομονώσεων Echo 30 αυξάνεται από 0% το 1969 έως 48% το 1998 σε σχέση με τις συνολικές απομονώσεις εντεροϊών. Επίσης, οι ιοί Echo 30 έχουν προκαλέσει μεγάλες επιδημίες με διάρκεια 2 έως 4 χρόνων, οι οποίες διαχωρίζονται από περιόδους όπου δεν παρατηρούνται πολλές απομονώσεις (Oberste S et al., 1999).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαφαίνεται ότι οι εντεροϊοί είναι υπεύθυνοι για ένα μεγάλο αριθμό κρουσμάτων άσηπτης μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα. Η μελέτη των αλληλουχιών της VP1 περιοχής είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την εύρεση του οροτύπου του εντεροϊού καθώς επίσης και για την επιδημιολογική παρακολούθηση των εντεροϊών. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στη VP1 γενωμική περιοχή έχουν συσχετιστεί με την μολυσματικότητα του ιού. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες της VP1 γενωμικής περιοχής των εντεροϊών και η συσχέτιση τους με εξάρσεις ιογενούς μηνιγγίτιδας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abad FX, Pintó RM, Bosch A., Disinfection of human enteric viruses on fomites ,FEMS Microbiol Lett. 1997 Nov 1;156(1):107–11.

Ackermann WW, Fujioka RS, Kurtz HB. Cationic modulation of the inactivation of poliovirus by heat.Arch Environ Health. 1970 Sep;21(3):377–1.

Ağın H, Apa H, Unalp A, Kayserili E. Acute disseminated encephalomyelitis associated with enteroviral infection. Neurosciences (Riyadh). 2010 Jan;15(1):46–8.

Akiyoshi K, Nakagawa N, Suga T. An outbreak of aseptic meningitis in a nursery school caused by echovirus type 30 in Kobe, Japan. Jpn J Infect Dis 2007;60:66–8.

Alirezaei M, Kemball CC, Whitton JL. Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease. Eur J Neurosci. 2011 Jan;33(2):197–204. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.

Ansardi DC, Porter DC, Anderson MJ, Morrow CD.mPoliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. Adv Virus Res. 1996;46:1–68.

Arola A, Santti J, Ruuskanen O, Halonen P, Hyypiä T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis., J Clin Microbiol. 1996 Feb;34(2):313–8.

Ashwell MJ, Smith DW, Phillips PA, Rouse IL. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia. Epidemiol Infect. 1996 Dec;117(3):507–12.

Avellón A, Casas I, Trallero G, Pérez C, Tenorio A, Palacios G. Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. Emerg Infect Dis. 2003 Aug;9(8):934–41.

Baily G. Are the elderly inadequately protected against tetanus? Lancet. 1996 Nov 16;348(9038):1389–90.

Baily JL, Chambon M, Henquell C, Icart J, Peigue-Lafeuille H, Genomic Variations in Echovirus 30 Persistent Isolates Recovered from a Chronically Infected Immunodeficient Child and Comparison with the Reference Strain, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 0095–1137/00/\$04.0010, Feb. 2000, p. 552–557.

Barclay W, Li Q, Hutchinson G, Moon D, Richardson A, Percy N, Almond JW, Evans DJ. Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons. J Gen Virol. 1998 Jul;79 (Pt 7):1725–34.

Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA–2 as a receptor for echovirus 1. Science. 1992 Mar 27;255(5052):1718–20.

Bergelson JM, Finberg RW., Integrins as receptors for virus attachment and cell entry. Trends Microbiol. 1993 Nov;1(8):287–8.

Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW., Cocksackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*. 1995 Mar;69(3):1903–6.

Bergelson JM, Modlin JF, Wieland–Alter W, Cunningham JA, Crowell RL, Finberg RW., Clinical coxsackievirus B isolates differ from laboratory strains in their interaction with two cell surface receptors. *J Infect Dis*. 1997 Mar;175(3):697–700.

Birch GM, Black T, Malcolm SK, Lai MT, Zimmerman RE, Jaskunas SR. Purification of recombinant human rhinovirus 14 3C protease expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 1995 Oct;6(5):609–18.

Blondel B, Duncan G, Couderc T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbère–Garapin F., Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol*. 1998 Feb;4(1):1–26.

Bolanaki E, Kottaridi C, Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Pratti A, Levidiotou–Stefanou S, Markoulatos P. Direct extraction and molecular characterization of enteroviruses genomes from human faecal samples. *Mol Cell Probes*. 2008 Jun;22(3):156–61

Boussadia O, Kutsch S, Hierholzer A, Delmas V, Kemler R., E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev*. 2002 Jul;115(1–2):53–62.

Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998, *J Virol*. 1999 Dec;73(12):9969–75. Erratum in: *J Virol*. 2000 Dec;74(24):12003.

Carrol ED, Beadsworth MB, Jenkins N, Ratcliffe L, Ashton I, Crowley B, Nye FJ, Beeching NJ. Clinical and diagnostic findings of an echovirus meningitis outbreak in the north west of England. *Postgrad Med J*. 2006 Jan;82(963):60–4.

Chamberlain MC (May 2005). "Neoplastic meningitis". *Journal of Clinical Oncology* 23 (15): 3605–13.

Chamberlain MC, Tsao–Wei D, Groshen S. Neoplastic meningitis–related encephalopathy. *J Neurooncol*. 2005 Apr;72(2):185–9.

Chang KH, Day C, Walker J, Hyypiä T, Stanway G., The nucleotide sequences of wild–type coxsackievirus A9 strains imply that an RGD motif in VP1 is functionally significant. *J Gen Virol*. 1992 Mar;73 (Pt 3):621–6.

Chu PY, Ke GM, Chen YS, Lu PL, Chen HL, Lee MS, Chen BC, Huang TS, Li YC, Chou LC, Wang SY, Lin KH. Molecular epidemiology of Cocksackievirus B3. *Infect Genet Evol*. 2010 Aug;10(6):777–84.

Clarkson NA, Kaufman R, Lublin DM, Ward T, Pipkin PA, Minor PD, Evans DJ, Almond JW. Characterization of the echovirus 7 receptor: domains of CD55 critical for virus binding, *J Virol*. 1995 Sep;69(9):5497–501.

Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T, Bergelson JM., Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25392–8.

Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science.* 1948 Jul 16;108(2794):61–2.

Dalwai A, Ahmad A Pacsa and W Al Nakib, Echvirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait. *J. 2009, Clin. Virol.* 44:48–51.

Dalwai A, Ahmad S, Al-Nakib W. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Virol J.* 2010 Sep 16;7:236. doi: 10.1186/1743-422X-7-236.

Danes L, Jaresová I. Neutralization microtest with human coxsackievirus and echovirus serotypes. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1985;29(4):399–408.

Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 2008 May;42(1):58–64.

Doedens JR, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 1995 Mar 1;14(5):894–907.

Domingo E, Martínez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortín J, López-Galindez C, Pérez-Breña P, Villanueva N, Nájera R, et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene.* 1985;40(1):1–8.

Domingo E, Martin V, Perales C, Escarmis C. Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;323:3–32.

Dorval BL, Chow M, Klibanov AM. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Mar 31;159(3):1177–83.

Dumaidi K, Frantzidou F, Papa A, Diza E, Antoniadis A. Enterovirus meningitis in Greece from 2003–2005: diagnosis, CSF laboratory findings, and clinical manifestations. *J Clin Lab Anal* 2006;20:177–83

Eberle KE, Nguyen VT, Freistadt MS. Low levels of poliovirus replication in primary human monocytes: possible interactions with lymphocytes. *Arch Virol.* 1995;140(12):2135–50.

Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):47–56.

Etchison D., Joachims M., Poliovirus infection results in structural alteration of a microtubule-associated protein. *J Virol.* 1992 October; 66(10): 5797–5804.

Evans Alfred S. and Kaslow Richard A., Plenum 1997, *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, Fourth Edition.

Fernández-Miragall O, López de Quinto S, Martínez-Salas E. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 2009 Feb;139(2):172–82.

Feuer Ralph, Ignacio Mena, Robb R. Pagarigan, Stephanie Harkins, Daniel E. Hassett, J. Lindsay Whitton, Coxsackievirus B3 and the Neonatal CNS: The Roles of Stem Cells, Developing Neurons, and Apoptosis in Infection, Viral Dissemination, and Disease, *Am J Pathol.* 2003 October; 163(4): 1379–1393.

Fields Bernard N; Knipe David M; Howley Peter M; et al, *Fields virology*, Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Filman DJ, Syed R, Chow M, Macadam AJ, Minor PD, Hogle JM. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 1989 May;8(5):1567–79.

Flint JA, Doré K, Majowicz SE, Edge VL, Sockett P. From stool to statistics: reporting of acute gastrointestinal illnesses in Canada. *Can J Public Health.* 2004 Jul–Aug;95(4):309–13.

Frantzidou F, Dumaidi K, Spiliopoulou A, Antoniadis A, Papa A. Echovirus 15 and autumn meningitis outbreak among children, Patras, Greece, 2005. *J Clin Virol* 2007;40:77–9.

Freistadt MS, Vaccaro JA, Eberle KE. Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virol J.* 2007 May 24;4:44.

Freistadt MS, Fleit HB, Wimmer E. Poliovirus receptor on human blood cells: a possible extraneural site of poliovirus replication. *Virology.* 1993 Aug;195(2):798–803.

Freistadt M S, Eberle K E, Correlation between poliovirus type 1 Mahoney replication in blood cells and neurovirulence. *J Virol.* 1996 September; 70(9): 6486–6492.

Cabrerizo M, Echevarria JE, Gonzalez I, de Miguel T, Trallero G. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 2008;80: 1018–24.

Gaggana M, Chan P, Ramsingh A, Identification of a single amino acid Residue in the Capsid Protein VP1 of Coxsackievirus B4 that Determines the Virulent Phenotype, *J Virol.* 1993, 67(8); 4797–4803.

Ginsberg L (March 2004). "Difficult and recurrent meningitis". *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75 Suppl 1: i16–21.

Golitsyna LN, Fomina SG, Novikova NA, Epifanova NV, Parfenova OV, Lukovnikova LB, Zverev VV, Ponomareva NV, Mazepa VN, Grigor'eva GI, Efimov EI. [Molecular genetic echovirus 9 variants identified in patients with aseptic meningitis in Russia in 2007–2009]. *Vopr Virusol.* 2011 Nov–Dec;56(6):37–42.

Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):839-47.

Gromeier M, Wimmer E. Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J Virol*. 1998 Jun;72(6):5056-60.

Gullberg M, Tolf C, Jonsson N, Polacek C, Precechtelova J, Badurova M, Sojka M, Mohlin C, Israelsson S, Johansson K, Bopegamage S, Hafenstein S, Lindberg AM. A single coxsackievirus B2 capsid residue controls cytolysis and apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. *J Virol*. 2010 Jun;84(12):5868-79. doi: 10.1128/JVI.02383-09. Epub 2010 Apr 7. Erratum in: *J Virol*. 2010 Aug;84(15):7922.

Handsher R, Shulman LM, Abramovitz B, Silberstein I, Neuman M, Tepperberg-Oikawa M, et al. A new variant of echovirus 4 associated with a large outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Virol* 1999;13:29-36.

Harris, L. F., R. E. Haynes, H. G. Cramblett, R. M. Conant, and G. R. Jenkins. 1973. Antigenic analysis of echoviruses 1 and 8. *J. Infect. Dis.* 127:63-68.

Heikkilä O, Susi P, Tevaluoto T, Härmä H, Marjomäki V, Hyypiä T, Kiljunen S. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by β 2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J Virol*. 2010 Apr;84(7):3666-81.

Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):581-91.

Hogle JM. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:677-702.

Hogle, J. M., M. Chow, and D. J. Filman. 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229:1358-1365.

Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, Lin KH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3653-62.

Hughes, P. J., C. North, P. D. Minor, and G. Stanway. 1989. The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol*. 70:2943-2952.

Hughes SA, Thaker HM, Racaniello VR. Transgenic mouse model for echovirus myocarditis and paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15906-11.

Hunter PR. The English sweating sickness, with particular reference to the 1551 outbreak in Chester. *Rev Infect Dis*. 1991 Mar-Apr;13(2):303-6.

Huttunen, P., J. Santii, T. Pulli, and T. Hyypia. 1996. The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *J. Gen. Virol.* 77:715–725.

Hymas WC, Aldous WK, Taggart EW, Stevenson JB, Hillyard DR. Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clin Chem.* 2008 Feb;54(2):406–13. Epub 2007 Nov 26.

Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S, The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):4460–9.

Iizuka, N., S. Kuge, and S. Nomoto. 1987. Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. *Virology* 156:64–73.

Iwai M, Yoshida H, Obara M, Horimoto E, Nakamura K, Takizawa T, Kurata T, Mizuguchi M, Daikoku T, Shiraki K. Widespread circulation of echovirus type 13 demonstrated by increased seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 May;17(5):764–70.

Inoue, T., T. Suzuki, and K. Sekiguchi. 1989. The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 70:919–934.

Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol.* 1993 Jun;67(6):2961–71.

Jackson CA, Messinger J, Peduzzi JD, Ansardi DC, Morrow CD. Enhanced functional recovery from spinal cord injury following intrathecal or intramuscular administration of poliovirus replicons encoding IL-10. *Virology.* 2005 Jun 5;336(2):173–83.

Jenkins, O., J. D. Booth, P. D. Minor, and J. W. Almond. 1987. The complete nucleotide sequence of coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 68:1835–1848.

Johnson RP, Aseptic meningitis in adults, UpToDate, 2003.

Joki-Korpela P, Hyypiä T. Parechoviruses, a novel group of human picornaviruses. *Ann Med.* 2001 Oct;33(7):466–71.

Kapsenberg, J. G. 1988. Picornaviridae: the enteroviruses (polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses), p. 692–722.

Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry, *J Clin Invest.* 2004 Jun;113(12):1743–53.

Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberste S and Pallansnh MA, Enterovirus surveillance– United States, 1970–2005. 2006, *MMWR Surveill. Summ.* 55:1–20.

Kim HJ, Kang B, Hwang S, Hong J, Kim K, Cheon DS. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virol J.* 2012 Feb 15;9:38.

Kottaridi C, Bolanaki E, Markoulatos P. Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol Cell Probes.* 2004 Aug;18(4):263-9.

Kottaridi E, Bolanaki Z, Mamuris C, Stathopoulos C, and P. Markoulatos *Arch Virol* (2006) 151: 1117-1132). Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation

Klingel R, Dippold W, Störkel S, Meyer zum Büschenfelde KH, Köhler H. Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease, and renal cell carcinoma. *Am J Kidney Dis.* 1992 Jan;19(1):22-30.

Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5813-21.

Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Marttila RJ, Kotilainen P. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid, stool, and serum specimens. *Clin Infect Dis.* 2005 Apr 1;40(7):982-7

Kuss SK, Etheredge CA, Pfeiffer JK. Multiple host barriers restrict poliovirus trafficking in mice. *PLoS Pathog.* 2008 Jun 6;4(6):e1000082.

Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pliaka V, Tsakogiannis D, Ruether IG, Krikelis A, Markoulatos P. Complete nucleotide sequence analysis of the VP1 genomic region of Echoviruses 6 isolated from sewage in Greece revealed 98% similarity with Echoviruses 6 that were characterized from an aseptic meningitis outbreak 1 year later. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Aug;17(8):1170-3. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03381.x. Epub 2011 Apr 12.

Kyriakopoulou Z, Tsois K, Pliaka V, Tsakogiannis D, Georgia I, Ruether A, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P, Combined 50 UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses *Arch Virol* (2013) 158:103-111.

Lancaster KZ, Pfeiffer JK. Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2010 Mar 5;6(3):e1000791.

Lane TE, Hosking MP. The pathogenesis of murine coronavirus infection of the central nervous system. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(2):119-30

Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jan;20(1):49-78.

Lewthwaite P, Perera D, Ooi MH, Last A, Kumar R, Desai A, Begum A, Ravi V, Shankar MV, Tio PH, Cardoso MJ, Solomon T. Enterovirus 75 encephalitis in children, southern India. *Emerg Infect Dis*. 2010 Nov;16(11):1780–2.

Logan A E Sarah and MacMahon Eithne, Viral meningitis, *BMJ*. 2008 January 5; 336(7634): 36–40.

Logotheti M, Pogka V, Horefti E, Papadakis K, Giannaki M, Pangalis A, Sgouras D, Mentis A. Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis outbreak in Greece during the summer of 2007. *J Clin Virol*. 2009 Nov;46(3):270–4.

Ma JF, Straub TM, Pepper IL, Gerba CP. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Nov;60(11):4203–6.

Madan V, Redondo N, Carrasco L. Cell permeabilization by poliovirus 2B viroporin triggers bystander permeabilization in neighbouring cells through a mechanism involving gap junctions. *Cell Microbiol*. 2010 Aug;12(8):1144–57.

Mantadakis E, Pogka V, Voulgari-Kokota A, Tsouvala E, Emmanouil M, Kremastinou J, Chatzimichael A, Mentis A. Echovirus 30 Outbreak Associated with a High Meningitis Attack Rate in Thrace, Greece. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Mar 1.

Malherbe P, Kew JN, Richards JG, Knoflach F, Kratzeisen C, Zenner MT, Faull RL, Kemp JA, Mutel V. Identification and characterization of a novel splice variant of the metabotropic glutamate receptor 5 gene in human hippocampus and cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002 Dec 30;109(1–2):168–78.

Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule–1 (ICAM–1) is a ligand for lymphocyte function–associated antigen 1 (LFA–1). *Cell*. 1987 Dec 4;51(5):813–9.

Martinez AA, Castillo J, Sanchez MC, Zaldivar Y, Mendoza Y, Tribaldos M, Acosta P, Smith RE, Pascale JM. Molecular diagnosis of echovirus 30 as the etiological agent in an outbreak of aseptic meningitis in Panama: May – June 2008. *J Infect Dev Ctries*. 2012 Dec 15;6(12):836–4.

Más Lago P, Cáceres VM, Galindo MA, Gary HE Jr, Valcarcel M, Barrios J, Sarmiento L, Avalos I, Bravo JA, Palomera R, Bello M, Sutter RW, Pallansch MA, de Quadros CA. Persistence of vaccine–derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Int J Epidemiol*. 2001 Oct;30(5):1029–34.

Melnick JL, Shaw EW, Curnen EC. A virus isolated from patients diagnosed as non–paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949 Jul;71(3):344–9.

Melnick JL. My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:1–24.

Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, Daikos GL, Lagona E, Douridas P, Mostrou G, Theodoridou M. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. PLoS One. 2007 Aug 1;2(7):e674.

Minami K, Tsuda Y, Maeda H, Yanagawa T, Izumi G, Yoshikawa N. Acute transverse myelitis caused by Coxsackie virus B5 infection. J Paediatr Child Health. 2004 Jan-Feb;40(1-2):66-8.

Minor PD, John A, Ferguson M, Icenogle JP., Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccine, J Gen Virol. 1986 Apr;67 (Pt 4):693-706.

Minor PD., Pipkin PA, Studies on the loss of infectivity of live type 3 poliovaccine on storage. Biologicals. 1998 Mar;26(1):17-23.

Mirand A, Archimbaud C, Henquell C, Michel Y, Chambon M, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. J Med Virol. 2006 Dec;78(12):1624-34.

Mirand A, Rouveyrol F, Chambon M, Archimbaud C, Regagnon C, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. Enterovirus genotyping directly from original clinical specimens: prospective application to a severe neonatal infection. J Clin Virol. 2009 Feb;44(2):177-8.

Modlin JF, Martino TA, Petric M, Weingartl H, Bergelson JM, Opavsky MA, Richardson CD, Finberg RW, Kain KC, Willis N, Gauntt CJ, Liu PP., The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. Virology. 2000 May 25;271(1):99-108.

Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, Flanagan JB. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis, J Virol. 2003 May;77(9):5136-44.

Moris G, Garcia-Monco JC (June 1999). "The Challenge of Drug-Induced Aseptic Meningitis". Archives of Internal Medicine 159 (11): 1185-94.

Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Tong L, Zlotnick A, Johnson JE, Rossmann MG. Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1995 Nov 1;51(Pt 6):871-87.

Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, van Loon AM., Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):202-27.

Mulders MN, Salminen M, Kalkkinen N, Hovi T. Molecular epidemiology of coxsackievirus B4 and disclosure of the correct VP1/2A(pro) cleavage site: evidence for high

genomic diversity and long-term endemicity of distinct genotypes. J Gen Virol. 2000 Mar;81(Pt 3):803–12.

Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. J Gen Virol. 2004 Oct;85(Pt 10):2981–9. Newcombe et al., 2003.

Nairn C, Clements GB. A study of enterovirus isolations in Glasgow from 1977 to 1997. J Med Virol 1999;58:304–12.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA and Pallansch MA, Typing of human enteroviruses by Partial Sequencing of VP, J. Clin. Microbiol. 1999, 37(5):1288

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA (1999b) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. J Virol 73: 1941–1948.

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. J Virol. 2002 Feb;76(3):1244–51.

Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. J Clin Microbiol. 1999 Dec;37(12):3928–33.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA and Pallansch MA, Typing of human enteroviruses by Partial Sequencing of VP, J. Clin. Microbiol. 1999, 37(5):1288

Ochs K, Saleh L, Bassili G, Sonntag VH, Zeller A, Niepmann M. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. J Virol. 2002 Mar;76(5):2113–22.

Ohman T, King SL, Krithivas A, Cunningham J, Dickeson SK, Santoro SA, Bergelson JM. Echoviruses 1 and 8 are closely related genetically, and bind to similar determinants within the VLA-2 I domain. Virus Res. 2001 Jul;76(1):1–8.

Ohka S, Matsuda N, Tohyama K, Oda T, Morikawa M, Kuge S, Nomoto A. Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. J Virol. 2004 Jul;78(13):7186–98.

Panackel C, Vishad, Cherian G, Vijayakumar K, Sharma RN (2006). "Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*". Ind J Med Microbiol 24 (3): 220–1.

Palacios G, Casas I, Tenorio A, Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):182–92.

Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol.* 2002 May;76(10):4940–9.

Pallansch MA., Oberste MS. Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1005:23–31.

Papa A, Dumaidi K, Franzidou F, Antoniadis A. Genetic variation of coxsackie virus B5 strains associated with aseptic meningitis in Greece. *Clin Microbiol.*

Papa A. & Skoura L. & Dumaidi K. & Spiliopoulou A. & Antoniadis A. & Frantzidou F., Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2009) 28:683–687. *Infect* 2006;12:688–91

Paul AV, Rieder E, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg., *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10359–70.

Pfister T, Wimmer E. Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):6992–7001.

Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 4;103(14):5520–5.

Pliaka V, Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotou S, Markoulatos P. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol Cell Probes.* 2007 Aug;21(4):267–75.

Pöyry T, Hyypiä T, Horsnell C, Kinnunen L, Hovi T, Stanway G. Molecular analysis of coxsackievirus A16 reveals a new genetic group of enteroviruses. *Virology.* 1994 Aug 1;202(2):982–7.

Powell RM, Schmitt V, Ward T, Goodfellow I, Evans DJ, Almond JW. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J Gen Virol.* 1998 Jul;79 (Pt 7):1707–13.

Prévôt D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell.* 2003 May-Jun;95(3–4):141–56.

Ramers C, Billman G, Hartin M, et al: Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on a patient management. *JAMA* 2000; 283:2680–2685.

Ramsingh AI, Lee WT, Collins DN, Armstrong LE. T cells contribute to disease severity during coxsackievirus B4 infection. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):3080–6.

Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. 2011 Mar 15;411(2):288–305.

Richter J, Koptides D, Tryfonos C, Christodoulou C. Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000–2002. *J Med Microbiol* 2006;55:1035–41.

Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*. 1987 Oct;160(2):311–22.

Robbins FC, Enders JF, Wellwe TH, Florentino GL. Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis. *Am J Hyg*. 1951 Sep;54(2):286–93.

Roivainen M, Piirainen L, Hovi T, Virtanen I, Riikonen T, Heino J, Hyypiä T. Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology*. 1994 Sep;203(2):357–65.

Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Dec;123(12):1161–9.

Rossmann MG. Viral cell recognition and entry. *Protein Sci*. 1994 Oct;3(10):1712–25

Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*. 2002 Jul;10(7):324–31.

Rotbart HA. Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Res*. 2002 Feb;53(2):83–98.

Rotbart HA, Kinsella JP, Wasserman RL. Persistent enterovirus infection in culture-negative meningoencephalitis: demonstration by enzymatic RNA amplification. *J Infect Dis*. 1990 Apr;161(4):787–91.

Roussarie JP, Ruffié C, Brahic M. The role of myelin in Theiler's virus persistence in the central nervous system. *PLoS Pathog*. 2007 Feb;3(2):e23.

Rueckert RR, Wimmer E. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol*. 1984 Jun;50(3):957–9.

Ruiz-Sáenz J, Goetz Y, Tabares W, López-Herrera A. Cellular receptors for foot and mouth disease virus. *Intervirology*. 2009;52(4):201–12. doi: 10.1159/000226121. Epub 2009 Jun 24.

Sáez-Llorens X, McCracken GH (June 2003). "Bacterial meningitis in children". *Lancet* 361 (9375): 2139–48.

Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol*. 2002 Feb;83(Pt 2):333–40.

Savolainen C, Hovi T, Mulders MN. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major genotype. *Arch Virol.* 2001;146(3):521–37.

Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Current Opinion in Pediatrics* 2001; 13:65–69.

Schermoly MJ, Hinthorn DR (April 1988). "Eosinophilia in coccidioidomycosis". *Arch. Intern. Med.* 148 (4): 895–6.

Shafren DR, Dorahy DJ, Greive SJ, Burns GF, Barry RD. Mouse cells expressing human intercellular adhesion molecule–1 are susceptible to infection by coxsackievirus A21. *J Virol.* 1997 Jan;71(1):785–9.

Shih SR, Stollar V, Li ML. Host factors in enterovirus 71 replication. *J Virol.* 2011 Oct;85(19):9658–66. doi: 10.1128/JVI.05063–11. Epub 2011 Jun 29.

Shih SR, Weng KF, Stollar V, Li ML. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. *J Neurovirol.* 2008 Jan;14(1):53–61.

Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Stanway G. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Lab Anal* 2001;15:87–95.

Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G (2002) Molecular classification of coxsackie A, viruses on the basis of the 5'–UTR: structural and evolutionary aspects. *J Mol Evol* 55: 638–652.

Siafakas N, Markoulatos P, Vlachos C, Stanway G, Tzanakaki G, Kourea–Kremastinou J (2003) Molecular sub–grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol Cell Probes* 17: 113–123.

Siafakas N, Markoulatos P, Levidiotou–Stefanou S. Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Mol Cell Probes.* 2004 Dec;18(6):389–98.

Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):483–93.

Solomon T, Willison H. Infectious causes of acute flaccid paralysis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Oct;16(5):375–81.

Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol.* 1990 Nov;71 (Pt 11):2483–501

Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA. A cell adhesion molecule, ICAM–1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell.* 1989 Mar 10;56(5):849–53.

Suhy DA, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol*. 2000 Oct;74(19):8953–65.

Sung Ho Cha, Recently Prevalent Infectious Diseases among Children: Meningitis due to Enteroviral Infection, *J Korean Med Assoc* 2008; 51(10): 935 – 941.

Tabor-Godwin JM, Ruller CM, Bagalzo N, An N, Pagarigan RR, Harkins S, Gilbert PE, Kiosses WB, Gude NA, Cornell CT, Doran KS, Sussman MA, Whitton JL, Feuer R. A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS. *J Neurosci*. 2010 Jun 23;30(25):8676–91. Tabor-Godwin et al., 2010.

Tam PE, Messner RP. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):10113–21.

Tebruegge M, Curtis N. Epidemiology, etiology, pathogenesis, and diagnosis of recurrent bacterial meningitis. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 519–37, July 2008.

Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3352–6. Travis Lim, 2008.

Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988–97). *Epidemiol Infect* 2000;124:497–506.

Triantafilou K, Fradelizi D, Wilson K, Triantafilou M. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J Virol*. 2002 Jan;76(2):633–43.

Triantafilou M, Triantafilou K, Wilson KM, Takada Y, Fernandez N, Stanway G. Involvement of beta2-microglobulin and integrin alphavbeta3 molecules in the coxsackievirus A9 infectious cycle. *J Gen Virol*. 1999 Oct;80 (Pt 10):2591–600.

Tryfonos C, Richter J, Koptides D, Yiangou M, Christodoulou CG. Molecular typing and epidemiology of enteroviruses in Cyprus, 2003–2007. *J Med Microbiol*. 2011 Oct;60(Pt 10):1433–40.

Tsang SK, McDermott BM, Racaniello VR, Hogle JM. Kinetic analysis of the effect of poliovirus receptor on viral uncoating: the receptor as a catalyst. *J Virol*. 2001 Jun;75(11):4984–9.

Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):111–8.

Tsai HP, Huang SW, Wu FL, Kuo PH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. An echovirus 18-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan: epidemiology and diagnostic and genetic aspects. *J Med Microbiol.* 2011 Sep;60(Pt 9):1360–5.

Tseng CH, Tsai HJ., Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus. *Virus Res.* 2007 Nov;129(2):104–14.

Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. (). Practice guidelines for the management of bacterial meningitis, November 2004.

Van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF (January 2006). "Community-acquired bacterial meningitis in adults". *The New England Journal of Medicine* 354 (1): 44–53.

Van den Pol AN. Viral infections in the developing and mature brain. *Trends Neurosci.* 2006 Jul;29(7):398–406. Epub 2006 Jun 27. Vignuzzi et al., 2006

Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S, Delwart E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol.* 2009 May;83(9):4642–51.

Vuorinen T, Vainionpää R, Vanharanta R, Hyypiä T. Susceptibility of human bone marrow cells and hematopoietic cell lines to coxsackievirus B3 infection. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):9018–23.

Wahid R, Cannon MJ, Chow M. Virus-specific CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell responses and long-term T-cell memory in individuals vaccinated against polio. *J Virol.* 2005 May;79(10):5988–95.

Ward T, Pipkin PA, Clarkson NA, Stone DM, Minor PD, Almond JW. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO J.* 1994 Nov 1;13(21):5070–4.

Weller PF, Liu LX (June 1993). "Eosinophilic meningitis". *Semin Neurol* 13 (2): 161–8. Weng et al., 2009.

Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *The Lancet* 2002; 359:507–514.

Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Oct;3(10):765–76.

Wimmer E, Nomoto A. Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus. *Biologicals.* 1993 Dec;21(4):349–56 Witwer, 2001

Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):798–801. doi: 10.1038/nm.1992. Epub 2009 Jun 21.

Yang WX, Terasaki T, Shiroki K, Ohka S, Aoki J, Tanabe S, Nomura T, Terada E, Sugiyama Y, Nomoto A. Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology*. 1997 Mar 17;229(2):421–8.

Ylipaasto P, Eskelinen M, Salmela K, Hovi T, Roivainen M. Vitronectin receptors, alpha v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *J Gen Virol*. 2010 Jan;91(Pt 1):155–65.

Yoon SY, Ha YE, Choi JE, Ahn J, Lee H, Kweon HS, Lee JY, Kim DH. Coxsackievirus B4 uses autophagy for replication after calpain activation in rat primary neurons. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11976–8.

Yoshikawa T, Iwasaki T, Ida-Hosonuma M, Yoneyama M, Fujita T, Horie H, Miyazawa M, Abe S, Simizu B, Koike S. Role of the alpha/beta interferon response in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. *J Virol*. 2006 May;80(9):4313–25.

Yozwiak NL, Skewes-Cox P, Gordon A, Saborio S, Kuan G, Balmaseda A, Ganem D, Harris E, DeRisi JL. Human enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua. *J Virol*. 2010 Sep;84(18):9047–58.

Zhao YN, Perlin DS, Park S, Jiang RJ, Chen L, Chen Y, et al. FDJS03 isolates causing an outbreak of aseptic meningitis in China that evolved from a distinct Echovirus 30 lineage imported from countries of the Commonwealth of Independent States. *J Clin Microbiol* 2006;44:4142–8.

Αναστασία Ρουμेलιώτη, Οδηγίες – Φύλλα Κατάρτισης Νοσημάτων, Νοέμβριος 2007.

<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1119136>

<http://www.hunter.cuny.edu/chemistry/faculty/Dixie/goss-group-1/protein-rna-interactions-protein-synthesis-in-viral-systems-and-plants>

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/polio.htm>

http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2785775_1423-0127-16-1032&query=the&fields=all&favor=none&it=none&sub=none&uniq=0&sp=none&req=4&simCollection=2873266_1745-6150-5-19-7&npos=16&ppt=3